

中山醫學大學口腔醫學研究所碩士論文
Master Thesis, Institute of Stomatology,
Chung Shan Medical University

胞漿素原活化劑與胞漿素原活化抑制劑在
根尖囊腫表現的研究

The study of the expression of
plasminogen activator and plasminogen
activator inhibitor in radicular cysts

指導教授：張育超 博士(Yu-Chao Chang, Ph.D)

研究生：翁聖豐(Sheng-Feng Weng)

中華民國九十二年六月

June, 2003

目錄

目錄-----	2
圖、表目錄-----	3
中文摘要-----	5
英文摘要-----	7
文獻回顧-----	9
研究目的-----	22
材料與方法-----	23
結果-----	42
討論-----	46
參考文獻-----	50
圖片-----	57
表格-----	70

圖、表目錄

圖一 根尖囊腫 H & E 染色 (100 倍率)-----	57
圖二 根尖囊腫 LCA 染色 (200 倍率)-----	58
圖三 根尖囊腫 H & E 染色 (200 倍率)-----	59
圖四 根尖囊腫 H & E 染色 (200 倍率)-----	60
圖五 根尖囊腫 H & E 染色 (200 倍率)-----	61
圖六 發炎的牙齦 tPA 染色 (400 倍率)-----	62
圖七 根尖囊腫 tPA 染色 (100 倍率)-----	63
圖八 根尖囊腫 tPA 染色 (200 倍率)-----	64
圖九 根尖囊腫 tPA 染色 (400 倍率)-----	65
圖十 發炎的牙齦 PAI-1 染色 (100 倍率)-----	66
圖十一 根尖囊腫 PAI-1 染色 (100 倍率)-----	67
圖十二 根尖囊腫 PAI-1 染色 (200 倍率)-----	68
圖十三 根尖囊腫 PAI-1 染色 (400 倍率)-----	69
(表一) 病患的背景資料-----	70
(表二) 標本的發炎程度與 t-PA、PAI-1 表現程度-----	71
(表三) 發炎程度與組織型胞漿素原活化劑表現程度-----	72
(表四) 發炎程度與胞漿素原活化抑制劑表現程度-----	73
(表五) tPA 與 PAI-1 的表現程度-----	74

(表六) 囊腫中 t-PA 與 PAI-1 的表現程度-----	75
(表七) 相對於選定血管內皮細胞的免疫染色的強度結果-----	76
(表八) tPA 與 PAI-1 表達細胞的分析-----	77
(表九) tPA、PAI-1 百分量化表現程度-----	78

壹、中文摘要

纖維蛋白溶解系統的胞漿素(plasmin)具有造成細胞間質裂解而使組織受破壞的特性，而纖維蛋白溶解系統由胞漿素原(plasminogen)與 plasmin 所組成；由於先前研究曾指出根尖囊腫具有纖維蛋白溶解活性，因此進一步的探討根尖囊腫中的胞漿素原活化劑(plasminogen activator)與胞漿素原活化抑制劑(plasminogen activator inhibitor)的表現，將有助於對根尖囊腫病理過程的了解。本實驗的目的在於探索組織型胞漿素活化劑(tissue type plasminogen activator; 簡稱 tPA)與第一型胞漿素原活化抑制劑(type I plasminogen activator inhibitor; 簡稱 PAI-1)，在根尖囊腫中表達的位置。本實驗取 30 個根尖囊腫病例，施以蘇木精與伊紅染色(hematoxylin and eosin)和免疫組織化學染色；每一個根尖囊腫標本皆製作一片蘇木精與伊紅染色切片，作為判定根尖囊腫的發炎程度依據；分析根尖囊腫中 tPA 或 PAI-1 的表現程度與發炎程度的關聯性，並以 Fisher's exact test 來檢定其是否具有統計學上的意義。實驗結果顯示在囊腫內襯上皮、結締組織、發炎細胞浸潤處和血管可發現具有 tPA 或 PAI-1 表達的細胞，tPA 主要表現在上皮細胞及發炎細胞，而 PAI-1 則主要表達在纖維母細胞、血管內皮細胞，

進一步以統計方法檢定後發現，tPA 的表現程度會隨根尖囊腫發炎程度的變化而變化 ($P<0.05$)；此外 PAI-1 表現程度也會隨根尖囊腫發炎程度的變化而變化 ($P<0.05$)。本研究證實根尖囊腫中同時具有胞漿素活化劑與胞漿素活化劑抑制劑的存在，且進一步指出 tPA 與 PAI-1 表現在根尖囊腫的上皮、發炎細胞、纖維母細胞、血管內皮細胞，另外根尖囊腫發炎程度也與 tPA 及 PAI-1 表達程度有相關。

關鍵詞：根尖囊腫，發炎，組織型胞漿素活化劑，第一型胞漿素活化抑制劑，免疫組織化學染色法。

貳、英文摘要

The plasminogen/plasmin proteolytic system participates in a wide variety of extracellular matrix degradation. Detailed knowledge of plasminogen activator and its inhibitor may be important for understand the pathogenesis of radicular cysts. The purpose of this study was to investigate the *in situ* localization of tissue type plasminogen activator (tPA) and type I plasminogen activator inhibitor (PAI-1) in radicular cysts. Thirty formalin-fixed, paraffin-embedded specimens of radicular cysts were examined using immunohistochemistry. A peroxidase-labeled streptavidin-biotin technique was used for identification of the tPA and PAI-1. One section from each radicular cyst specimen was stained with hematoxylin and eosin to assess the presence of the inflammatory infiltrates. Differences in tPA or PAI-1 expression between tissue with low and high levels of inflammation were subsequently analyzed using Fisher's exact test. Both tPA and PAI-1 positively stained cells were detected in the lining epithelium, connective tissue, inflammatory infiltrates, and endothelium. In addition, the tPA signal

was mainly expressed in epithelial cells, infiltrating cells . However, the PAI-1 signal was mainly expressed in fibroblasts. Moreover, significantly greater tPA as well as PAI-1 expression was noted in radicular cysts with high levels of inflammation as compared to tissues with low levels of inflammatory cell infiltrates ($P < 0.05$). The present study confirms earlier indications of local production of plasminogen activator and its inhibitor in radicular cysts. In addition, this study further shows that the tissue localization of the antigen for tPA or PAI-1 and demonstrates that the expression of both tPA and PAI-1 increases with the grade of inflammation in radicular cysts.

Keyword: Radicular cyst, Inflammation, Tissue type plasminogen activator, Type I plasminogen activator inhibitor, Immunohistochemistry

叁、文獻回顧

(A) 根尖囊腫 (radicular cyst)

*形成原因

根尖囊腫 (radicular cyst) 被歸類為一種發炎性的囊腫 (inflammatory cyst) (Kramer *et al.* 1992)，其形成原因係由於健康完整的牙齒受到破壞，形成齲齒病灶後，進一步持續刺激齒髓 (pulp)，造成齒髓組織壞死，進而在牙齒根尖處形成根尖肉芽腫 (periapical granuloma)，而牙周韌帶中的馬拉式上皮殘屑 (rest of Malassez)，受到持續刺激而造成上皮增殖進而導致根尖囊腫的形成 (Bhaskar 1986)。

根尖囊腫形成的初期為根尖附近上皮殘屑上的增殖，形成形狀不規則的細胞團塊 (irregular pattern of cells)，隨後細胞團塊繼續分裂，與表皮的基底細胞層分裂方式相似，上皮細胞團塊中，位於邊緣處的細胞繼續分裂、增殖而增大；位於中心處的細胞漸愈形遠離結締組織，血管及組織液來的營養無法供應到中心處的細胞，最終中心處細胞變性、壞死而液化。小囊腔形成後，囊腔內部因細胞破壞及蛋白分解後所含胺基酸等分子濃度變高，經由滲透壓之差異而逐漸滲入液體，漸漸擴大，即形成根尖囊腫 (Shafer *et al.* 1963)。

*臨床表徵

根尖囊腫為顎骨齒源性囊腫中最常見的一種，大約佔顎骨齒源性囊腫病例總數的 52.3 %至 65.15 % (Shear 1992;Kreidler 1993; Daley 1994)，好發於 20 歲到 60 歲的病人的上顎前牙區 (Shear 1992)，病例似乎稍多發生在男性，在乳牙的病例並不常見，經常在定期的牙醫門診 X 光檢查時發現 (Sciubba *et al.* 2001)，有時伴隨有些許輕微腫脹和疼痛。

根尖囊腫一般出現於牙齒根尖處，導因於牙齒受齲齒感染齒髓，受感染的齒髓腔在根尖處形成根尖肉芽腫，所以經常在受感染而失去活性的牙齒的根尖處，可以發現根尖囊腫形成；但有些牙齒因為具有側根管而使得病灶區出現在牙根的側方區，成為另一種形式的根尖囊腫 (Shafer *et al.* 1963)。

由於根尖囊腫所侵犯的牙齒常伴隨有嚴重的齲齒或曾經受到化學性的刺激或物理性的刺激如強大外力，因而造成所見到被囊腫所侵犯的牙齒都不具有活性。當根尖囊腫病灶擴大時，可造成骨頭吸收，進而穿通顎骨與軟組織，由於上顎前牙區皮質骨較薄所以這個區域的根尖囊腫常穿通到頰側前庭區，同時根尖囊腫具有溶解骨頭而使有些病例有瘻管(fistula)形成 (Sciubba *et al.* 2001)。

根尖囊腫乃是一種慢性發炎過程，有一部分根尖囊腫因急性發作，迅速形成膿腫再發展成蜂窩性組織炎(cellulitis)，或形成引流瘻管。有些根尖囊腫因囊腔內液體滲透壓高，不斷吸入水分繼續不斷增大，導致壓力增加而膨脹；之後膨脹方向朝組織承受壓力最脆弱之處膨脹，造成齒槽骨(alveolar bone)的海綿樣髓質骨部分，在根尖囊腫開始向外膨大時就喪失。根尖囊腫的囊腔在髓質骨內向前後膨脹，使鄰近牙齒因壓力而傾斜，使其牙根分開而牙冠相聚攏。牙根的吸收則甚輕微，故根尖囊腫以牙齒移位為特徵，而非牙根吸收。少數的囊腫可大到侵犯中心髓質骨與外層皮質骨(Regezi & Sciubba 1993)。

*放射線學診斷

根尖囊腫的 X 光片影像表現與根尖肉芽腫相似，在牙根尖具有放射線透射病灶(radiolucent lesion)；有少部分特殊的根尖囊腫，它們的放射線透射區出現於牙根側方。

在根尖囊腫的 X 光片影像中，可發現牙周韌帶與齒槽骨間的硬板(lamina dura)消失，若侵犯的牙齒已經完成根管治療(endodontic treatment)，在其完成根管治療的 X 光片影像中，可能會因含有治療過程中過度填充的物質，而使根尖囊腫中有放射線

阻射區(radiopaque lesion)出現。單憑 X 光片影像，對於根尖囊腫與根尖肉芽腫要作鑑別診斷是不足夠的，無法用來確定此放射線透射區的疾病。由於根尖囊腫的變化大多數與根尖肉芽腫相同，其根尖處的放射線透射影像，兩者往往無法區別 (Sciubba *et al.* 2001)。

根尖肉芽腫在經根管治療除去慢性刺激來源後，病灶區可能慢慢治癒縮小，病灶區可再有齒槽骨所充填，治療完成後的 X 光片中，放射線透射區會消失；但根尖囊腫雖亦經相同治療，卻無法獲得相同結果。根尖囊腫多是由根尖肉芽腫發展而來的慢性進行性病變，所以根尖囊腫多較根尖肉芽腫大；偶而有些根尖囊腫在放射透射區邊緣有一些放射線阻斷細線，乃是骨頭對緩慢膨大病灶的反應 (Shafer *et al.* 1963)。

*病理學診斷

根尖囊腫的囊腔(cyst lumen)內襯為非角化複層鱗狀上皮(nonkeratinizing stratified squamous cell epithelium)覆蓋，有微細血管散佈在皮下的結締組織中，囊腔或囊壁(cyst wall)常見有膽固醇的晶體(cholesterol crystal)出現，可發現巨細胞(giant cells)和巨噬細胞存在於膽固醇裂隙(cholesterol crystal clefts)中，在囊壁中有漿細胞

(plasma cell)、淋巴球(lymphocytes)、巨噬細胞(macrophages)等發炎細胞浸潤，巨噬細胞常成串出現而呈現泡沫化型態表現，在根尖囊腫上皮內襯細胞會混合一些黏膜細胞(mucous cells)，當個別的上皮細胞因營養不足而鈣化，上皮內襯中可發現上皮內玻璃體(intraepithelial hyaline bodies)形成(Matthews 1991；Rushton 1955)。這些玻璃體不只在根尖囊腫中可看到，在含牙囊腫(dentigerous cysts)、齒源性角化囊腫(odontogenic keratocysts)也發現有玻璃體的存在 (Morgan & Johnson 1974)。

一般說來根尖囊腫覆蓋上皮(lining epithelium)通常是非角化複層鱗狀上皮，唯一的例外是侵犯的上頷竇的上頷牙齒根尖囊腫，其上皮有的是偽覆層纖毛柱狀上皮(pseudo-stratified columnar ciliated epithelium)或呼吸道上皮(Wring 1979)，一般而言根尖囊腫的上皮厚薄不一，有時因炎症，脫落而中斷。網釘(rete peg)偶見發生。即使長期炎症刺激，亦少出現類似角化不良(dyskeratosis)等細胞變化，緊鄰上皮的結締組織一律有炎性浸潤，通常是淋巴球及漿細胞，並有少數多核白血球。有些囊腫壁上可見膽固醇裂隙及多核巨細胞，有些則出現充滿脂肪或吞噬細胞 (Shafer *et al.* 1963)。

*治療方式

顎骨中的囊腫治療上多採用囊腫摘除術(cyst enucleation)、造袋術(marsupialization)、造袋術合併囊腫摘除術、囊腫摘除術合併周圍顎骨去除(neighbor bone curettage)(Perterson *et al.* 1993)。

根尖囊腫一旦形成後，只施行去除根管內的感染病灶，這樣的做法仍無法使囊腫消退而完全治癒；若只採取囊腫侵犯處的牙齒拔除，牙齒拔掉後囊腫往往仍然存在。所以根尖囊腫與根尖肉芽腫在治療上稍有不同，治療根尖囊腫，除了拔除無法複形的牙齒外，根尖附近組織並應小心刮除。在進行根管治療時，應加以根尖截除術除去囊腫。若能徹底摘除囊腫，則不再發。如果治療過程沒有摘除囊腫，或因囊腫破裂，導致囊腫摘除不完全，則殘留的上皮數月或數年之後亦可再發生囊腫，亦即所謂殘留囊腫(residual cyst)(Sciubba *et al.* 2001)。

(B) 生理性調控因子在根尖囊腫的表現

根尖囊腫係由於持續的發炎反應所導致的病灶，在囊腫脹大的發炎過程伴隨有纖維蛋白溶解(fibrinolytic)、齒槽骨吸收(osteolysis)與細胞間質裂解(cell matrix degradation)等現象；在正常生理的狀況下，胞漿素(plasmin)可使纖維蛋白溶解，同時金屬蛋白酶(matrix metalloproteinase；簡稱 MMP)可使細胞外間質裂解，因此 plasmin 與 MMP 可能因參與纖維蛋白溶解過程，而造成根尖囊腫的病灶。目前在根尖囊腫被發現的生理性調控因子有下列數種因子：Interleukin-1 (IL-1)、Interleukin-6 (IL-6)、Prostaglandin E₂ (PGE₂)、Interleukin-8 (IL-8)、Tumor necrosis factor α (TNF- α)、Matrix metalloproteinases (MMPs)、Cyclooxygenase-2 (COX-2)、Heat shock proteins (HSP)、Inducible nitric oxide synthase (iNOS)。上述的生理性調控因子相關文獻回顧分述如下：

1975 年 Ruitter 等人抽取 6 位患有動脈瘤骨囊腫(Aneurysmal bone cysts)病人的囊液，同時也從每位病人身上抽取動脈血與靜脈血，比較三種體液後，發現囊液中的纖維蛋白溶解活性皆遠大於動脈血與靜脈血，且在囊腫中的血管內皮可見到大量胞漿素活化劑的表現。

1976 年 Sugimura 等人利用離心萃取方法研究顎骨囊腫的內容

物，發現在造釉細胞瘤(ameloblastoma)、含牙囊腫(follicular cyst)、根尖囊腫皆可發現有纖維蛋白溶解活性的表達；其中造釉細胞瘤的纖維蛋白溶解的活性最強，但在根尖囊腫中，則存在有一些抑制性因子，而使根尖囊腫中纖維蛋白溶解的活性變弱；而在造釉細胞瘤中，這些抑制纖維蛋白溶解的因子卻很少。

1993 年 Bando 等人運用免疫組織化學染色方法，研究根尖囊腫造成顎骨破壞吸收的過程，與探討囊腫中所產生血管的型態。發現根尖囊腫中的內襯上皮細胞與血管內皮細胞中發現有 IL-1 α 與 IL-1 β 的表達，此外上皮細胞有 IL-6 的表達，巨噬細胞有 TNF- α 的表達；在根尖囊腫的內皮細胞，可以發現血管內皮細胞結合接受器—ELAM-1(endothelial leukocyte adhesion molecule)的表達；在上皮細胞、內皮細胞、單核球有血管內皮細胞結合接受器 ICAM-1(inter-cellular adhesion molecule)的表達。

1995 年 Formigli 等人利用螢光染色方法研究根尖囊腫造成顎骨吸收過程，在囊腫片段靠近齒槽骨那一端的區域中，發現有為數不少具有 TRAP (tartrate-resistant acid phosphatase)表達的多核細胞，在囊腔(cyst capsule)中也可發現有 TRAP 表達的單核細胞，在其根尖囊腫的囊液中可偵測到大量 PGE2；同時利用 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)的技術發現根尖囊

腫的囊液中可測得大量 IL-6 的存在。

1997 年 Lin 等人運用免疫組織化學染色方法，在根尖囊腫的內襯上皮，囊壁的纖維母細胞、巨噬細胞、血管內皮細胞、成骨母細胞(osteoblasts)與骨細胞(osteocytes)可見到 MMP-1 的表達；在根尖囊腫的成骨母細胞與骨細胞、血管內皮細胞、浸潤在囊壁結締組織的發炎細胞可見到 tissue inhibitor of metalloproteinases-1(TIMP-1)的表達。

2002 年 Tsai 等人運用免疫組織化學染色方法，於根尖囊腫中發現，在囊腫標本的內襯上皮細胞；上皮下層的纖維母細胞，巨噬細胞，血管內皮細胞都有 COX-2 的表達；同時以 α -ACT 抗體染色發現有許多巨噬細胞浸潤在囊腫中，證明根尖囊腫為慢性發炎反應。

2002 年 Suzuki 等人免疫組織化學染色研究根尖發炎病灶，探討發炎的上皮內襯增殖反應機制中，根尖囊腫上皮內襯中測出有 iNOS，HSP60，HSP80 等蛋白的表達。

(C) 纖維蛋白溶解系統(fibrinolytic system)

纖維蛋白溶解系統含有胞漿素原(plasminogen)，它可以被胞漿素原活化劑(plasminogen activator；簡稱 PA)轉化成胞漿素(plasmin)，以執行裂解纖維蛋白的任務(Collen & Lijnen 1991)。胞漿素原是一個具有 791 個氨基酸，分子量約 92 KDa 的蛋白質，經由酵素作用切斷 Arg561-Val562 的鏈結而成胞漿素(Collen 1999)。

* 胞漿素 / 胞漿素原活化劑系統 (plasmin/plasminogen activator system)

胞漿素由兩段蛋白組成，一段具有五個相似的 kringle domain，這些結構中具有 lysine-binding sites，而藉由這些位置和纖維蛋白及 2-antiplasmin 作用。另一段則含有 active sites: His-602，Asp-645 和 Ser-740 (Wimman 1977)，胞漿素原活化劑藉由這些位置，將胞漿素原轉變成胞漿素；胞漿素原活化劑刺激胞漿素原變成胞漿素是引起纖維蛋白溶解作用的重要步驟。

胞漿素可在發炎處的血管被發現，存在於組織間液的一種絲氨酸蛋白酶(serine proteinase)—胞漿素原活化劑，將胞漿素原活化為胞漿素。不僅造成纖維蛋白分解；同時胞漿素會活化膠原水解酶原(procollagenases)與金屬蛋白酶(MMP)，因此胞漿素也有參與

發炎病灶的組織破壞(Vassalli 1994)。

胞漿素原在血漿和細胞間液的濃度約 1-2 μM ，胞漿素原受胞漿素原活化劑而轉變為胞漿素，胞漿素可與纖維蛋白(fibrin)結合而使血漿凝塊溶解，使血管不致阻塞而造成血栓疾病(Vassalli *et al.* 1991)。

由於纖維蛋白溶解系統可調控細胞間的蛋白質分解，進而導致結締組織列解至病灶區擴大；胞漿素原活化劑刺激胞漿素原變成胞漿素是引起纖維蛋白溶解作用的重要步驟，因此胞漿素原活化劑在發炎反應中，進而造成組織破壞扮演關鍵角色。

*胞漿素原活化劑 (plasminogen activator)

胞漿素原活化劑主要含有組織型(tissue-type plasminogen activator, tPA)及尿型(urokinase-type, uPA)的胞漿素原活化劑。uPA 是由尿中所分離的，主要來自腎臟。而 tPA 則是生理情況下最重要也最主要的胞漿素原活化劑。它是一種絲胺酸蛋白，分子量約為 68 KDa，由 530 個氨基酸組成，基因位在人類第八條染色體上。幾乎所有組織均有 tPA，含量較多者為腺體，內皮細胞是主要生產者。

當受傷或承受壓力時由血管內皮細胞釋放至循環系統中的一

種絲胺酸蛋白酶，它只有在和纖維蛋白結合才具有活性。在與纖維蛋白結合時，組織型胞漿素原活化劑在血漿凝塊中將胞漿素原分解行成胞漿素，胞漿素再將纖維蛋白分解為可溶性分解產物而使血漿凝塊分解(Robert *et al.* 1998)。胞漿素和胞漿素原均無法和這些分解產物結合，以致於它們可以融入體液中，被其天然抑制劑加以去活性。

尿激酶原(prourokinase)是胞漿素原的第二種活化劑的前驅物，尿激酶(urokinase)對纖維蛋白並不存著相同高程度的選擇性。尿激酶是由某些分泌管腺(如腎小管)裡襯的表面細胞所分泌的，可能牽涉到將沉積在這些管線中的蛋白加以分解(Robert *et al.* 1998)。

tPA 目前用於治療冠狀動脈阻塞的心臟病患者，患者服用 t-PA 後造成血液中胞漿素濃度升高，血液中大量的胞漿素消化血液中的纖維蛋白，避免血栓產生，減少血管阻塞風險 (Eric 1998)。

*胞漿素原活化抑制劑 (plasminogen activator inhibitor)

抑制纖維蛋白溶解作用的因子有胞漿素原活化抑制劑 (plasminogen activator inhibitor; 簡稱 PAI)，主要是抑制 plasminogen activator 的作用。PA/plasmin 系統中共有四種抑制劑(Andreasen *et*

al. 1990), 而體內最重要的 PAI 是 PAI-I 和 PAI-2, 前者由內皮細胞產生;後者由單核球產生。

血漿中的 PAI 大多為 PAI-1(Vassalli 1991), PAI-1 是 t-PA 最主要的抑制劑, PAI-1 是一種活化的抗蛋白酶(antiprotease), 但被分泌製造出後立即轉成非活化狀態, 直到遇到磷脂質(phospholipids)等因子才又再被活化, 在血漿和細胞間中經常可見, PAI-1 以活化型態穩定存在 (Seiffert *et al.* 1990)。

許多可溶性的物質都會調控 tPA 和 PAI-1 的產生, 例如:thrombin (Dichek & Quertermous,1989)、phorbol myristate actate (PMA)(Levin *et al.* 1989)和 butyric acid (Kooistra1987)都會引起 tPA 的表現;而 thrombin 同時會引起 PAI-1 表現 (Dichek & Quertenous 1989)。

生物體內的調控因子也會對 tPA 和 PAI-1 的表現有影響。在細胞培養的系統上, IL-1 會引起 tPA 的 mRNA 及蛋白質的表現而抑制 PAI-1 的表現, 而 TGF-1 β 則有相反的作用(Wilson *et al.* 1997; Rox *et al.* 1996)。在人體內, TNF 會先引起 tPA 的產生而後再引起 PAI-1 量的上升;而在細胞培養時, 卻引起內皮細胞 PAI-1 量的增加而抑制的 tPA 生成 (Van Hinsbergh *et al.*1990)。

肆、研究目的

在人類發炎組織處，常伴隨有纖維蛋白溶解反應，造成病灶，2003年 Chang 等人培養人類的齒髓與牙齦造纖維母細胞，經 IL-1 α 、TNF- α 等 cytokine 刺激後，以 RT-PCR 技術分析，發現這些發炎因子會使齒髓和牙齦造纖維母細胞都誘發 tPA 基因的表達；此外 Yang 等人(2003)年利用細胞培養的方法，將人類齒髓與成骨細胞以細菌刺激後，發現會同時誘發細胞表達 tPA 與 PAI-1 基因，這些研究說明了 plasmin/plasminogen activator 系統可能在齒髓根尖疾病上扮演一個非常重要角色。

早期 Sugimura 等人(1976)等人用萃取方式中測出，根尖囊腫中具有纖維蛋白溶解活性，發現囊腫中有胞漿素原活化劑存在，同時也有抑制胞漿素原活化劑的因子的存在，而使得根尖囊腫中胞漿素原活化劑的強度，表達並不強，但是對於根尖囊腫的胞漿素原活化劑與其抑制因子的細胞間來源並不明瞭。本實驗以免疫組織化學方法，來探討根尖囊腫這一種慢性發炎的疾病，tPA 與 PAI-1 在根尖囊腫中，各種型態細胞的表現情況與表達的程度。

伍、材料與方法

(A) 材料

*特殊玻片：MICRO SLIDES GLASS Silane Coating (Muto pure chemicals CO., LTD)。

*使用的抗體

稀釋液：DAKO Antibody Diluent with Background Reducing Components (DAKO Corporation, capinteria, CA, 93013, USA)。

tPA 一抗：goat anti-human tissue plasminogen activator polyclonal antibody (CHEMICON Internation, Inc CA, 92590, USA)。

tPA 二抗：donkey anti-goat IgG-HRP sc-2020,LOT#J1402,HRP conjugated (Santa Cruz, Bio-technology Inc., Santa Cruz, CA, USA)。

PAI-1 抗體：PAI-1 (H-135) cat#sc8979 LOT#L120 rabbit polyclonal IgG (Santa Cruz, Bio-technology Inc., Santa Cruz, CA, USA)。

Anti-LCA (CD45)抗體：Monoclonal Mouse anti-leukocyte common antigen, CD45 (LCA),clones PD7/26 (human peripheral

blood lymphocytes maintained on T-cell growth factor) and 2B11 (isolated neoplastic cells from T-cells lymphoma/leukemia)(DAKO Corporation, Carpinteria, CA, 93013, USA)。人類的 leukocyte common antigen (LCA) 是位於 leukocyte 表面的醣蛋白群，其分子量介於 180 至 220 kDa；PD7/26 會與淋巴球(lymphocytes)、單核球(monocytes)，2B11 會與淋巴球、單核球結合，因此標本中若有淋巴球存在，則經 CD45 免疫染色則會出現表達。

*使用的機器

一、H&E 染色機器：SAKURA DIVERSIFIED STAINER DRS-60

二、免疫染色機器：VENTANA ES Automated Slide Stainer

三、免疫染色劑：Ventana Medical System Proteinase 1 Reagent Kit

Reagents:

- (1) Inhibitor solution (Hydrogen peroxide, sodium azide solution)
- (2) Universal Biotinylated Ig Secondary Antibody (Anti-mouse and rabbit antibodies in protein stabilizer and preservative)
- (3) Streptavidin-HRPO Conjugate (Streptavidin horseradish peroxidase in protein stabilizer and preservative)
- (4) Hydrogen Peroxide Solution (Hydrogen Peroxide Solution) Substrate Solution (3-Amino-9-ethylcarbazole (AEC) in a stabilizer solution and preservative)

(B) 標本的來源

所收集的 30 個根尖囊腫的病理標本(表一)，病患皆在中山醫學大學附設醫院牙科部接受囊腫摘除手術(cyst enucleation)，手術治療前其臨床 X 光片中，牙尖區(apex)皆具有邊緣界限明確(well defined border)的放射線透射區(radiolucency)；接受手術治療後，取下的標本經病理學科診斷後，皆認定為根尖囊腫的標本。

本實驗所收集的 30 個標本中男女各佔 15 位，年齡層在 20 歲以下共 8 位，其中男性病患佔 4 位，女性病患 4 位；20 歲至 40 歲的患者族群共 10 位，其中男性病患佔 4 位，女性病患共 6 位；40 歲至 60 歲病患共 8 位，其中男性病患佔 3 位，女性病患 5 位；60 歲以上共 4 位皆為男性病患。30 位病患的平均年齡 35.63 歲(表一)。

*組織處理

利用組織自動處理裝置，程序如下

(1) 浸泡於 10 %福馬林溶液 1 小時作為固定之用，(2) 水浸泡 30 分鐘，(3) 80 %酒精脫水 1 小時，(4) 95 %酒精脫水 1 小時，(5) 95 %酒精脫水 2 小時，(6) 100 %酒精脫水 1 小時，(7) 100 % 酒精脫水 1 小時，(8) 100 %酒精脫水 2 小時，(9) 浸入二甲苯 1 小時使組織標本透明，(10) 浸入二甲苯 2 小時使組織標本透明，(11) 浸潤於石臘 1 小時，(12) 浸潤石臘 2 小時，最後由石臘中移出組織片，隨即以石臘包埋成形。

*切片標本製備

- 1 臘塊標本組織取樣。
- 2 薄切 5 μm ，放在特殊玻片。
- 3 每一個取樣標本臘型製作 4 個玻片標本。
- 4 將標本玻片置入 50°C 的烤箱乾燥放置一晚，使薄切的標本與特殊玻片更加貼合。

*H&E (Hematoxylin-Eosin Stain) 染色製備過程

- (1) Hot dry 20 分。
- (2) xylene 5 分、xylene 5 分、xylene 5 分。
- (3) 100 % alcohol 30 秒、95 % alcohol 30 秒、
- (4) 80 % alcohol 30 秒、75 % alcohol 30 秒。
- (5) 二次水 wash 1 分。
- (6) Gill's Hematoxylin 浸泡 2 分鐘。
- (7) 水洗 5 分、水洗 5 分、水洗 5 分。
- (8) Eosin-Y (加 3 ml Acetic acid)。
- (9) 水洗 30 秒。
- (10) 80 % alcohol 30 秒。
- (11) 95 % alcohol 30 秒。
- (12) 95 % alcohol 30 秒。
- (13) 100 % alcohol 30 秒。
- (14) 100 % alcohol 30 秒。
- (15) 100 % alcohol 30 秒。
- (16) xylene 1 分。
- (17) xylene 1 分。
- (18) xylene 1 分。之後封片。

*LCA 抗體免疫染色過程

- (1) 開啓免疫染色機器電源，使免疫染色程式運行。
- (2) 將玻片標本連續浸潤在 xylene 5 分鐘三次使其脫臘；之後將玻片標本浸潤在 100 % alcohol 30 秒、95 % alcohol 30 秒、80 % alcohol 30 秒、75 % alcohol 30 秒，然後將玻片標本浸泡在二次水中 5 分鐘。
- (3) 將玻片標本浸潤在 citric acid 後放入壓力鍋，加壓、加熱 20 分鐘後，將玻片由壓力鍋取出；水洗 5 分鐘後，在玻片貼上 Barcode (32 號條碼)，將染色試劑放於試劑轉盤上，將玻片置於染色機的玻片轉盤上，並覆蓋上一層二次水，蓋上蓋子使機器運行，輸入玻片數目，檢查沖洗液及轉盤上的染色試劑量是否足夠，檢查廢液桶是否已滿，等待約 20 分鐘，機器會有叫聲，打開蓋子，逐一加入 3 滴 CD45 抗體到玻片中，再蓋上蓋子，按 "Enter"；等待約一小時，機器再有響聲時，表示染色已完成，之後將玻片取出，浸潤於清潔劑中 5 分鐘，再置於水中清洗 10 分鐘，將玻片置於 Hematoxylin 中施行背景染色染 30 秒，立即沖水 10 分鐘後封片。

*tPA 抗體免疫染色製備過程

tPA 抗體製備

一抗: goat anti-human tissue plasminogen activator (tPA) polyclonal antibody (CHEMICON Internation, Inc CA, 92590, USA)加入 DAKO Antibody Diluent with Background Reducing Components (DAKO Corporation, capinteria, CA, 93013, USA) 稀釋液採一比五十倍稀釋。

二抗: Donkey anti-goat IgG-HRP sc-2020, LOT#J1402, HRP conjugated (Santa Cruz, Bio-technology Inc., Santa Cruz, CA, USA) 加入 DAKO Antibody Diluent with Background Reducing Components (DAKO Corporation, capinteria, CA, 93013, USA) 稀釋液採一比五十倍稀釋。

*tPA 抗體免疫染色過程

- (1) 開啓免疫染色機器電源，使免疫染色程式運行。
- (2) 將玻片標本連續浸潤在 xylene 5 分鐘三次使其脫臘；之後玻片標本浸潤在 100 % alcohol 30 秒，95 % alcohol 30 秒，80 % alcohol 30 秒，75 % alcohol 30 秒，然後將玻片標本浸泡在二次水中 5 分鐘。
- (3) 將稀釋(1:50)製備好的 tPA 二抗與染色試劑放於試劑轉盤上；在玻片貼上 Barcode (1 號條碼)，之後將標本玻片置於染色機器的玻片轉盤上，同時加入一塊發炎的牙齦標本玻片作為對照組 (Xiao 1998)，並逐一在全部玻片覆蓋上一層二次水，蓋上蓋子使機器運行，輸入玻片數目，檢查沖洗液及染色試劑量是否足夠，檢查廢液桶是否已滿，然後等待約 20 分鐘，機器會有叫聲，打開蓋子，逐一加入稀釋 (1:50)製備好的 tPA 一抗 100 μ l，再蓋上蓋子，按 "Enter"，等待約一小時，機器再有響聲時，表示染色已完成，將玻片取出，浸潤於清潔劑中 5 分鐘，再置於水中清洗 10 分鐘，將玻片置於 Hematoxylin 中作背景染色染 30 秒，立即沖水 10 分鐘後封片。

*PAI-1 抗體免疫染色製備過程

抗體製備

PAI-1 抗體：PAI-1(H-135) cat#sc8979 LOT#L120 rabbit polyclonal

IgG (Santa Cruz, Bio-technology Inc., Santa Cruz, CA, USA) 加

入 DAKO Antibody Diluent with Background Reducing

Components (DAKO Corporation, Carpinteria, CA, 93013, USA)

稀釋液採一比五十倍稀釋。

*PAI-1 抗體免疫染色

- (1) 開機，使免疫染色程式運行。
- (2) 玻片標本浸潤在 xylene 5 分鐘三次使其脫臘；玻片標本浸潤在 100 % alcohol 30 秒，95 % alcohol 30 秒，80 % alcohol 30 秒，75 % alcohol 30 秒，然後玻片標本浸潤在二次水 1 分鐘。
- (3) 將染色試劑放於免疫染色機器的試劑轉盤上，玻片置於染色機器的玻片轉盤上，加入一塊發炎的牙齦標本玻片作為對照組 (Xiao 1998)，並逐一在全部玻片覆蓋上一層二次水，蓋上蓋子，使機器運行，輸入玻片數目，檢查沖洗液及染色試劑量是否足夠，檢查廢液桶是否已滿，等待約 20 分鐘，機器會有叫聲，打開蓋子，加入稀釋 (1:50) 製備好的 PAI-1 抗體 100 μ l，再蓋上蓋子，按 "Enter"，等待約一小時，機器再有響聲時，表示染色完成，將玻片取出，浸潤於清潔劑中 5 分鐘，再置於水中清洗 10 分鐘，將玻片置於 Hematoxylin 中作背景染色 30 秒，立即沖水 10 分鐘後封片。

(C)發炎程度與 tPA 與 PAI-1 的表現程度半定量化

*發炎程度的半定量化標準

標本在低倍率下(40 倍至 100 倍)光學顯微鏡下觀察，選擇標本中發炎細胞最多區域作為標地。固定視野，將觀察倍率放大固定在 200 倍。

- (1) 若在此放大倍率 200 倍視野中，發炎細胞區塊佔視野面積未達 $\frac{1}{3}$ ，則紀錄標本的發炎程度為 Degree I。
- (2) 若在此放大倍率 200 倍視野中，發炎細胞區塊佔視野面積超過 $\frac{1}{3}$ 但未達 $\frac{2}{3}$ ，則紀錄標本的發炎程度為 Degree II。
- (3) 若在此放大倍率 200 倍視野中，發炎細胞區塊佔視野面積超過 $\frac{2}{3}$ ，則紀錄標本的發炎程度為 Degree III。

反覆觀察紀錄三次，在三次紀錄中判定最多次的表現程度作為發炎程度的最後結果。

*tPA 表現程度的半定量化標準

標本在低倍率(40 倍至 400 倍)光學顯微鏡中觀察，尋找 tPA 呈現陽性(tPA positive)最密集的區域。選定目標區域後，固定視野，將觀察倍率放大固定在 200 倍。

- (1) 若在此放大倍率 200 倍視野中，tPA 呈現陽性的區塊合計佔全

部視野面積未達 1/3，紀錄此標本 tPA 的表現程度為 Degree I。

(2) 若在此放大倍率 200 倍視野中，tPA 呈現陽性的區塊合計佔全部視野面積超過 1/3 但未達 2/3，紀錄此標本 t-PA 的表現程度為 Degree II。

(3) 若在此放大倍率 200 倍視野中，tPA 呈現陽性的區塊合計佔全部視野面積超過 2/3，紀錄此標本組織型 t-PA 的表現程度為 Degree III。

反覆觀察紀錄三次，在三次紀錄中判定最多次的表現程度，作為 tPA 表現程度的最後結果。

*PAI-1 表現程度的半定量化

將標本至於低倍率(40 倍至 400 倍)的光學顯微鏡下觀察，尋找 PAI-1 呈陽性(PAI-1 positive)表現最密集區域。選定目標區域後，固定視野，將倍率放大固定於 200 倍。

(1) 若在此固定放大倍率 200 倍視野中，胞漿素原活化抑制劑呈陽性的區塊合計佔視野面積未達 1/3，紀錄此標本 PAI-1 的表現程度為 Degree I。

(2) 若在此固定放大倍率 200 倍視野中，胞漿素原活化抑制劑呈陽

性但未達 2/3，紀錄此標本 PAI-1 的表現程度為 Degree II。

- (3) 若在此固定放大倍率 200 倍視野中，胞漿素原活化抑制劑呈陽性的區塊合計佔視野面積超過 2/3，紀錄此標本 PAI-1 的表現程度為 Degree III。

反覆觀察紀錄三次，在三次紀錄中判定最多次的表現程度，作為 PAI-1 表現程度的最後結果。

(D) 探討 tPA 與 PAI-1 的相關性時，將 tPA 與 PAI-1 的表現程度作進一步的半定量化

*tPA 表達程度半定量化

觀察尋找 tPA 呈現陽性最密集的區域。選定目標區域後，固定視野，將觀察倍率放大固定在 200 倍。

(1) 若在此放大倍率 200 倍視野中，tPA 呈現陽性的區塊合計佔全部視野面積未達 1/2，紀錄此標本 tPA 的表現程度為 L (low)(表六)。

(2) 若在此放大倍率 200 倍視野中，tPA 呈現陽性的區塊合計佔全部視野面積相當或超過 1/2，紀錄此標本 tPA 的表現程度為 H (high)(表六)。

反覆觀察紀錄三次，在三次紀錄中判定最多次的表現程度，作為 tPA 表現程度的最後結果。

*PAI-1 表達程度半定量化

觀察尋找 PAI-1 呈現陽性最密集的區域。選定目標區域後，固定視野，將觀察倍率放大固定在 200 倍。

(1) 若在此放大倍率 200 倍視野中，PAI-1 呈現陽性的區塊合計佔全部視野面積未達 1/2，紀錄此標本 PAI-1 的表現程度為 L

(low)(表六)。

- (2) 若在此放大倍率 200 倍視野中，PAI-1 呈現陽性的區塊合計佔全部視野面積相當或超過 1/2，紀錄此標本 PAI-1 的表現程度為 H (high)(表六)。

反覆觀察紀錄三次，在三次紀錄中判定最多次的表現程度，作為 PAI-1 表現程度的最後結果。

(E) 探討 tPA 與 PAI-1 在不同細胞的表達強度 (Intensity)

*tPA 的表現強度半定量化

觀察 tPA 有表達的標本中的內皮細胞，選擇一個表達強烈的血管內皮細胞作為表達強度的標準。標本中所有 tPA 呈陽性的細胞族群中(要將血管內皮細胞排除)。

(1) 若表達強度大於或等於選定的血管內皮細胞，符合此條件的細胞總數，在 tPA positive 的細胞族群中比例相等於或大於 50%，紀錄此標本的 tPA 表達強度為 2 (表七)。

(2) 若表達強度大於或等於選定的血管內皮細胞，符合此條件的細胞總數，tPA positive 的細胞族群中比例不超過 50%，紀錄此標本的 tPA 表達強度為 1 (表七)。

反覆觀察紀錄 3 次，在 3 次紀錄結果中，取判定最多次的強度作為最終判定結果。

*PAI-1 的表現強度半定量化

觀察 PAI-1 有表達標本中的血管內皮細胞，選擇一個 PAI-1 表現強烈的血管內皮細胞作為表達強度的標準。標本中所有 PAI-1 positive 的細胞族群中(要將血管內皮細胞排除)。

(1) 若表達強度大於或等於選定的血管內皮細胞，符合此條件的細胞總數，在 PAI-1 positive 的細胞族群中比例相等或大於 50%，紀錄此標本的 PAI-1 表達強度為 2 (表七)。

(2) 若表達強度大於或等於選定的血管內皮細胞，符合此條件的細胞總數，在 PAI-1 positive 的細胞族群中比例不超過 50%，紀錄此標本的 PAI-1 表達強度為 1 (表七)。

反覆觀察紀錄 3 次，在 3 次紀錄數據中，取判定最多次的強度(Intensity)作為最終判定結果。

(F) 統計方法

- 1、 比較根尖囊腫中 tPA 表現程度與其發炎程度的差異時，運用 Fisher's exact 統計方法作檢定，以 $P < 0.05$ 為具有統計學上之意義。
- 2、 比較根尖囊腫中 PAI-1 表現程度與其發炎程度時運用 Fisher's exact 統計方法作檢定，以 $P < 0.05$ 為具有統計學上之意義。
- 3、 比較根尖囊腫中 PAI-1 表現程度與 tPA 表現程度時運用 Fisher's exact test 統計方法作檢定，以 $P < 0.05$ 為具有統計學上之意義。
- 4、 將 tPA 或 PAI-1 的表現程度分成 high 與 low 兩個等級時，比較根尖囊腫中 tPA 表現程度與 PAI-1 表現程度時運用 Fisher's exact test 統計方法作檢定，以 $P < 0.05$ 為具有統計學上之意義。
- 5、 分析 tPA 表達細胞種類百分比，運用二項式統計方法，以 $P < 0.05$ 為具有統計學上之意義。
- 6、 分析 PAI-1 表達細胞種類百分比，運用二項式統計方法，以 $P < 0.05$ 為具有統計學上之意義。

陸、結果:

在光學顯微鏡觀察下，30 個標本皆具有根尖囊腫的典型表現：囊腔中都有部分或全部，出現有非角化覆層鱗狀上皮覆蓋，位於上皮內襯下的纖維結締組織中，有不同程度發炎細胞與纖維母細胞浸潤其中，而在囊壁的結締組織中則可發現有小血管存在(圖一)；將標本用 LCA 來作免疫染色後，發現標本中大部分都是淋巴球(圖二)，因此可說明根尖囊腫的標本皆處於慢性發炎狀態下。

*探討發炎程度與 tPA 和 PAI-1 的表現程度的關係

依本實驗對發炎程度量化與 tPA 和 PAI-1 的表現程度來看，在光學顯微鏡下，觀察 30 個標本的發炎程度，發炎程度(degree) I (圖三)有 5 個病例(16.67%)；發炎程度(degree) II (圖四)有 9 個病例(30%)；發炎程度(degree) III (圖五)有 16 個病例(53.33%)(表二)。

tPA 在做為正對照組的發炎牙齦的血管內皮細胞有強烈表達(圖六)。

tPA 在囊腫的上皮細胞(圖七)有表達 30 例，纖維母細胞有表達(圖八)14 例(46.67%)，血管內皮細胞有表達(圖八)30 例(100%)，

囊壁中的淋巴球有表達(圖九)30 例(100%)。依本實驗所訂的表現程度來看，表現程度(degree) I 有 4 個病例(13.33%)，表現程度(degree) II 有 17 個病例(56.67%)，表現程度(degree) III 有 9 個病例(30%) (表二) ，以 Fisher's exact test 統計方法來作檢定發炎程度與 t-PA 表達時具有顯著意義($P < 0.05$)(表三)，發現 tPA 表現程度與發炎程度有相關存在。

PAI-1 在做爲正對照組的發炎的牙齦上皮、血管內皮中有表達(圖十)。

PAI-1 在囊腫上皮細胞有表達(圖十一)7 例(23.33 %)，皮下的血管內皮細胞有表達(圖十一)30 例(100 %)，纖維母細胞有表達(圖十二)23 例(76.67%)，淋巴球有表達(圖十三)16 例(53.33%)。依本實驗所訂的表現程度來看表現程度(degree)的統計紀錄結果：表現程度(degree) I 有 7 個病例(23.33%)，表現程度(degree) II 有 10 個病例(33.33%)，表現程度(degree) III 有 13 個病例(43.33%) (表二) ，以 Fisher's exact test 統計方法來作檢定發炎程度與 PAI-1 表達時具有顯著意義($P < 0.05$) (表四)，發現 PAI-1 與發炎有正相關存在。

*探討 tPA 與 PAI-1 表達程度間的關係

將 tPA 表達與 PAI-1 表達以 Fisher's exact test 統計方法來作檢

定後，發現兩者無顯著相關($P>0.05$) (表五)。

依發炎程度分類規則，發現 tPA 表現程度大多為 II，依本實驗對 tPA 和 PAI-1 表現程度的另一種形式分類，觀察標本中 30 個病例中 tPA 呈現 H 有 15 個病例，呈現 L 的反應也有 15 個病例 (表六)；30 個病例中 PAI-1 呈現 H 有 15 個病例，呈現弱的反應也有 15 個病例 (表六)，將根尖囊腫中 tPA 和 PAI-1 的表現程度強弱以 Fisher's exact test 統計方法來作檢定後，發現兩者具有統計學上的意義 (表六)。

*探討 tPA、PAI-1 在細胞中的表現強度

依本實驗中與血管內皮比較的表現強度來看，tPA 的表現強度，表現強度 1 有 15 個病例(50%)，表現強度 2 有 15 個病例(50%)；PAI-1 的表現強度與血管內皮比較後，表現強度 1 共 15 個病例(50%)，表現強度 2 共 15 個病例(50%) (表七)。

*比較 tPA 與 PAI-1 在各種細胞的表現

若病例為 PAI-1 表現較強(表現強度 2)有 15 個病例，其中 13 個病例 (80 %) 表達細胞大多為纖維母細胞 (圖十三)，而有 2 個病例 (20%)其表達細胞大多為淋巴球，以二項分佈統計方法作檢定具有顯著差異($P<0.05$)；若病例為 tPA 表現較強(表現強度 2)有

14 個病例(93 %)其表達細胞大都為淋巴球，只有 1 個病例(7 %)表達細胞大都為纖維母細胞，以二項分佈統計方法作檢定具有顯著差異($P < 0.05$) (表八)。

柒、討論

本實驗利用免疫組織化學染色方法，發現根尖囊腫同時具有 tPA 與 PAI-1 的表達，在上皮層、囊壁中的淋巴球、血管內皮，可發現 tPA 的表達，這些發現支持先前的生化學研究，根尖囊腫內含有 plasminogen activator 和其抑制劑 antiplasmin (Sugimura *et al.* 1976)，此外我們的實驗結果也認同，之前關於發炎的牙齦組織的研究，在發炎的牙齦可以同時見到 tPA 和 PAI 的表達(Xiao *et al.* 1998; Kinnby *et al.* 1999; Lindberg *et al.* 2001)，綜合來說 tPA 與 PAI 的表達在根尖囊腫的病理形成過程中可能扮演一個重要的角色。

微生物可以活化纖維蛋白溶解系統而誘發組織破壞，或藉由微生物釋放出蛋白酶直接造成細胞間質的裂解(Birkedal 1993)，內生性破壞路徑的活化由免疫反應所調控，導致細胞間質分解。經由本實驗，我們以免疫組織化學染色方法證實根尖囊腫有 tPA 表達，尤其在發炎的根尖囊腫上皮有較高的 tPA 表達，與之前在發炎的牙齦上皮也具有較高程度的 tPA 表達(Schmid *et al.* 1991)相符合。

最近的研究指出根管致病菌、IL-1 α 和 TNF- α 可刺激人類牙髓造纖維母細胞、牙齦造纖維母細胞和成骨母細胞誘發產生 tPA，

因此啓動組織裂解(Ueda & Matsushima 2001 ; Yang *et al.* 2003 ; Chang *et al.* 2003) ; 先前的研究亦發現根尖囊腫有 IL-1 α , IL-6 , TNF- α 和 cyclooxygenase-2 (Bando *et al.* 1993 ; Formigli *et al.* 1995 ; Honma *et al.* 1998 ; Tsai *et al.* 2002)等發炎因子的存在。因此根尖囊腫中的 tPA 的表達可能是直接由細菌誘發壞死的齒髓而產生，或間接由發炎先驅因子對此部位的細胞刺激產生。因此這些細胞在根尖囊腫的病理形成過程，控制發炎調控因子先驅物與 tPA 的合成，扮演一個重要性角色。

胞漿素藉由活化 MMP 而間接造成膠原崩解(Vassalli & Pepper 1994)，先前一些研究指出，在根尖囊腫可看到 MMP-1 (Teronen *et al.* 1995 ; Lin *et al.* 1997)，MMP-2 (Teronen *et al.* 1995)與 MMP-9 (Kubota *et al.* 2000)的表達，然而 MMP 與 tPA 在根尖囊腫的病理形成過程值得進一步地研究探討，而根尖囊腫被認為導因於受感染的根管中持續有抗原刺激，由於根尖囊腫在顎骨內生長，囊腫的漲大與乃決定於囊腫上皮的生長與囊腫週遭的骨破壞速率，因此根尖囊腫漲大的可能機制也許是因 tPA 被活化後的結果。

PAI-1 被認為是人類血漿中最常見的 tPA 抑制劑(Sprengers & Kluft 1987)，PAI-1 除了與 tPA 會與結合而相互抑制，PAI-1 也會與血液細胞間質中的 vitronectin 結合。由 PAI-1 所調控 PA 的活

性，在纖維蛋白溶解系統中是一個重要的調控步驟。本實驗中，PAI-1 伴隨著血管出現，但在囊腫內襯上皮則不常見，這些結果與 Gissler 等人(1993)在正常表皮所發現 PAI-1 的表達結果相似，在高度發炎的根尖囊腫病例中，PAI-1 主要可在皮下的纖維母細胞與淋巴球有表達，這些結果與 Linderg 等人(2001)和 Yang 等人(2003)的研究結果類似，此外，在體外實驗中牙髓造纖維母細胞與成骨母細胞經致病菌的刺激後也可提升 PAI-1 的表現程度(Yang *et al.* 2003)，而本實驗中 PAI-1 的表達會隨著發炎程度而升高($P < 0.05$)，因此 PAI-1 在發炎的病理過程中也扮演一重要的角色。

本實驗中不僅 tPA 在根尖囊腫有表達同時 PAI-1 也有表達，然而纖維蛋白溶解系統在根尖囊腫中的的生理性角色卻不十分明顯，細菌和囊腫的非角化上皮的高滲透性啟動發炎反應，訊息傳遞介質活化區域中各種細胞，造成 tPA 與 PAI-1 的活性都會升高。PAI-1 的增加或許是因 tPA 增加後的生理性反應，由於纖維蛋白溶解系統中胞漿素原與胞漿素保持良好平衡，因此組織的恆定得以保持，藉此可以解釋相較於其它顎骨齒源性囊腫，根尖囊腫乃是一個生長較緩慢的疾病。

許多研究指出纖維蛋白溶解系統參與各種發炎性疾病，藉由特定的胞漿素原活化劑與抑制劑作用，胞漿素原活化的調控是促

成細胞間質的蛋白溶解的重要步驟，本實驗中，tPA 與 PAI-1 在上皮細胞，囊壁的淋巴球、纖維母細胞，血管內皮細胞有表達，在上述這些細胞，其胞漿素原活化劑與胞漿素原活化抑制劑皆被活化，而造成互相拮抗作用，可能使根尖組織受破壞的趨勢產生改變，或許 tPA 與 PAI-1 相互間關係的改變，可決定根尖囊腫是否持續變大。

捌、參考文獻

- Bajou K. Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and vascularization. *Nat Med* 1998; 4: 923–28.
- Bando Y, Henderson B, Meghji S, Poole S, Harris M. Immunocytochemical localization of inflammatory cytokines and vascular adhesion receptors in radicular cyst. *J Oral Pathol Med* 1993; 22: 221-7.
- Bhaskar SN. Periodontal ligament. In: Orban's oral histology and embryology tenth edition 1986; 198-231.
- Birkedal-Hansen H. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol* 1995; 7: 728-35.
- Birkedal-Hansen H. Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. *J Periodont Res* 1993; 28: 500-10.
- Chang YC, Yang SF, Huang FM, Tai KW, Hsieh YS. Induction of tissue plasminogen activator gene expression by proinflammatory cytokines in human pulp and gingival fibroblasts. *J Endodon* 2003; 29: 118-20.
- Collen D. The plasminogen system. *Thromb Hemost* 1999; 82:

259-70.

Collen D, Lijene HR. Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. *Blood* 1991; 78: 3114-24.

Dichek D, Quertermous T. Thrombin regulation the mRNA levels of the plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Blood* 1989; 74: 222-8.

Daley TD, Wysocki GP, Pnngle GA. Relative incidence of odontogenic tumors and oral and jaw cysts in a Canadian population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994; 77: 276-80.

Eric JT. Cardiovascular medicine:a history prespective. In: *Textbook of cardiovascular medicine*. Lippincott-raven publishers 1998; 1-10.

Formigli L, Zecchi Orlandini S, Tonelli P, Giannelli M, Martini M, Brandi ML, Bergamini M, Orlandini GE. Osteolytic processes in human radicular cysts. *J Oral Pathol Med* 1995; 24: 416-20.

Honma M, Hayakawa Y, Kosugi H, Koizumi F. Localization of Mrna for inflammatory cytokines in radicular cyst tissue by *in situ* hybridization, and induction of inflammatory cytokines by

human gingival fibroblasts in response to radicular cyst content. J Oral Pathol Med 1998; 27: 399-404.

James J, Sciubba, John E, Fantasia, Leonard B, Kahn. Tumor and cysts of the jaws. In: Atlas of tumor pathology third series fascicle 29. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, D.C. 2001; 11-3.

Kinnby B, Lindberg P, Lecander I, Matsson L. Localization of plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors in human gingival tissues demonstrated by immunohistochemistry and in situ hybridization. Arch Oral Biol 1999; 44: 1027-34.

Kramer IR, Pindborg JJ, Shear M. Histologic typing of odontogenic tumors 2nd edition. Geneva: World Health Organization. 1992.

Kubota Y, Ninomiya T, Oka S, Takenoshita Y, Shirasuna K. Interleukin-1 α -dependent regulation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) secretion and activation in epithelial cells of odontogenic jaw cysts. J Dent Res 2000; 79: 1423-30.

Levin EG, Marotti K, Santell L. Protein kinase C and the stimulation of plasminogen activator release from human endothelial cells. Dependence on the elevation of messenger RNA. J Biol Chem

1989; 264: 16030-6.

Lin SK, Chiang CP, Hong CY, Lin CP, Lan WH, Hsieh CC, Kuo MYP.

Immunolocalization of interstitial collagenase (MMP-1) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in radicular cysts. *J Oral Pathol Med* 1997; 26: 458-63.

Lindberg P, Kinnby B, Lecander I, Lang PN, Matsson L. Increasing

expression of tissue plasminogen activator and plasminogen inhibitor type 2 in dog gingival tissues with progressive inflammation. *Arch Oral Biol* 2001; 46: 23-31.

Matthews JB. Hyaline bodies in the wall of odontogenic cysts In:

Browne RM. *Investigative pathology of the odontogenic cysts*
Boca Raton: CRC Press, 1991:191-209.

Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. Plasma

proteins, immunoglobulins, and blood coagulation. In: *Harper's biochemistry* 25th edition. Lange medical publications. 1998; 737-62.

Peter LJ, Ellis E, Hupp JR, Tucker MR. Surgical management of oral

pathologic lesion. In: *Contemporary oral and maxillofacial surgery*
second edition. 1993; 526-53.

- Ruiter DJ, Lindeman J, Haverkate F, Hegt NV. Fibrinolytic activity in aneurysmal bone cysts. *Am J Clin Pathol* 1975; 64: 810-6.
- Rushton MA. Hyaline bodies in the epithelium of dental cysts. *Proc Royal Soc Med* 1955;48 :407-9.
- Regezi JA, Sciubba J. Cysts of the oral region. In: *Oral pathology* 2nd edition. Saunders W.B. 1993; 322-6.
- Schmid J, Cohen RL, Chambers DA. Plasminogen activator in human periodontal health and disease. *Arch Oral Biol* 1991; 36: 245-50.
- Shafer WG, Hine MK, Levy BM. Disease of pulp and periapical tissue. In: *A textbook of oral pathology* 2nd edition. Saunders W.B. 1963; 378-407.
- Sugimura M, Kashibayashi Y, Tsubakimoto M, Ban I, Kawakatsu K. Fibrinolytic activity in cystic lesions of jaw bones. *Int J Oral Surg* 1976; 5: 166-71.
- Suzuki T, Kumamoto H, Ooya K, Motegi K. Expression of inducible nitric oxide synthase and heat shock proteins in periapical inflammatory lesions. *J Oral Pathol Med* 2002; 488-493.
- Teronen O, Salo T, Kontinen YT, *et al.* Identification and characterization of gelatinase/type IV collagenase in jaw cyst. *J*

- Oral Pathol Med 1995; 24: 78-4.
- Tsai CH, Huang FM, Yang LC, Chou MY, Chang YC.
Immunohistochemical location of cyclooxygenase-2 in radicular
cysts. *Int Endodon J* 2002; 35: 854-8.
- Van Hinsbergh VW, Bauer KA, Kooistra T, Dooijewaard CK,
Sherman ML, Nieuwenhuizen W. Progress of the fibrinolysis
during the tumor necrosis factor in fusions in human.
Concomitant increase in tissue- type plasminogen activator,
plasminogen activator inhibitor type-1, and fibrinogen
degradation products. *Blood* 1990; 76: 2284-9.
- Vassalli JD, Pepper MS. Membrane proteinase in focus. *Nature* 1994;
370: 14-5.
- Vassalli JD, Sappino AP, Berlin D. The plasminogen activator/plasmin
system. *J Clin Invest* 1991; 88: 1067-72.
- Wiman B. Primary structure of the B-chain of human plasmin. *Eur J
Biochem* 1977; 76: 159-65.
- Xiao Y, Bunn CL, Bartold PM. Immunohistochemical demonstration
of the plasminogen activator system in human gingival tissues
and gingival fibroblast. *J Periodont Res* 1998; 33: 17-26.

Yang SF, Hsieh YS, Huang FM, Yang LC, Chang YC. Effect of black-pigmented bacteria on the plasminogen-plasmin system human pulp and osteoblastic cells. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2003; 95: 621-5.

玖、圖片

圖一 根尖囊腫 H & E 染色 (100 倍率)

典型的囊腫特徵：非角化覆層鱗狀上皮內襯，囊壁發炎細胞與纖維母細胞浸潤其中

圖二 根尖囊腫 LCA 染色 (200 倍率)

紅色表達為 Lymphocytes，證實根尖囊腫為慢性發炎病灶

圖三 根尖囊腫 H & E 染色 (200 倍率)

發炎程度 Degree I：發炎細胞佔視野中不到三分之一。

圖四 根尖囊腫 H & E 染色 (200 倍率下)

發炎程度 Degree II：發炎細胞佔視野中超過三分之一，
但未滿三分之二。

圖五 根尖囊腫 H & E 染色 (200 倍率)

發炎程度 Degree III：發炎細胞佔視野中超過三分之二。

圖六 發炎の牙齦 tPA 染色 (400 倍率)

在血管內皮與上皮有 tPA 的表達

圖七 根尖囊腫 tPA 染色 (100 倍率)

內襯上皮、囊壁淋巴球、纖維母細胞、血管有 tPA 的表達

圖八 根尖囊腫 tPA 染色 (200 倍率)

囊壁淋巴球、血管內皮細胞、纖維母細胞有 tPA 的表達



圖九 根尖囊腫 tPA 染色 (400 倍率)

皮下淋巴球有強烈 tPA 的表達

圖十 發炎の牙齦 PAI-1 染色 (100 倍率)

結締組織中の血管内皮細胞有 PAI-1 の表達

圖十一 根尖囊腫 PAI-1 染色 (100 倍率)

內襯上皮、囊壁的血管內皮細胞、纖維母細胞有 PAI-1 的
表達

圖十二 根尖囊腫 PAI-1 染色 (200 倍率)

囊壁的血管內皮細胞、纖維母細胞有 PAI-1 的表達

圖十三 根尖囊腫 PAI-1 染色 (400 倍率下)

囊壁的血管內皮細胞、纖維母細胞有 PAI-1 的表達

拾、表格

(表一) 病患的背景資料

標本編號	性別	年齡
1	♀	13
2	♂	36
3	♂	41
4	♂	13
5	♂	13
6	♀	8
7	♂	31
8	♀	11
9	♀	58
10	♂	37
11	♀	15
12	♀	20
13	♂	11
14	♂	61
15	♂	9
16	♂	77
17	♀	49
18	♂	48
19	♀	39
20	♀	29
21	♀	33
22	♂	64
23	♂	33
24	♀	38
25	♂	46
26	♀	47
27	♀	42
28	♂	77
29	♀	26
30	♀	22

(表二) 標本的發炎程度與 t-PA、PAI-1 表現程度

標本編號	H&E	t-PA	PAI-1
1	I	I	I
2	III	II	I
3	II	III	II
4	I	II	II
5	II	II	II
6	II	II	III
7	II	II	III
8	I	I	I
9	III	II	III
10	III	II	III
11	III	II	III
12	II	III	II
13	I	II	I
14	III	III	III
15	III	II	III
16	III	III	III
17	III	III	II
18	III	II	III
19	III	II	II
20	III	II	III
21	II	I	II
22	III	II	II
23	II	III	II
24	II	III	I
25	II	II	I
26	III	III	III
27	I	I	I
28	III	III	II
29	III	II	III
30	III	II	III

t-PA：經免疫染色後，標本中各種細胞合計表達 t-PA 的程度。

PAI-1：經免疫染色後，標本中各種細胞合計表達 PAI-1 的程度。

(表三)

發炎程度與組織型胞漿素原活化劑表現程度

		t-PA 表現程度			TOTAL
		I	II	III	
發炎程度	I	3	2	0	5
	II	1	4	4	9
	III	0	11	5	16
	TOTAL	4	17	9	30

Fisher's exact test : $P=0.02$

(表四)

發炎程度與胞漿素原活化抑制劑表現程度

		PAI-1表現程度			TOTAL
		I	II	III	
發炎程度	I	4	1	0	5
	II	2	5	2	9
	III	1	4	11	16
TOTAL		7	10	13	30

Fisher's exact test : P=0.003

(表五)

t-PA 與 PAI-1 的表現程度

		PAI-1表現程度			TOTAL
		I	II	III	
tPA 表現程度	I	3	1	0	4
	II	3	4	10	17
	III	1	5	3	9
TOTAL		7	10	13	30

Fisher's exact test : P=0.056

(表六)

囊腫中 t-PA 與 PAI-1 的表現程度

		t-PA 表現程度		TOTAL
		L	H	
PAI-1 表現程度	L	2	13	15
	H	13	2	15
TOTAL		15	15	

Fisher's exact test: P=0.000

(表七)

相對於選定血管內皮細胞的免疫染色的強度結果

標本編號	t-PA 強度	PAI-1 強度
1	1	2
2	2	1
3	2	1
4	2	1
5	1	2
6	2	2
7	2	1
8	1	2
9	2	1
10	2	2
11	1	2
12	2	1
13	1	2
14	1	2
15	2	1
16	1	2
17	2	1
18	1	2
19	1	1
20	2	1
21	1	2
22	2	1
23	1	2
24	1	1
25	2	1
26	1	2
27	1	2
28	2	1
29	2	1
30	1	2

(表八)

tPA 與 PAI-1 表達細胞的分析

主要表達細胞	Lymphocytes	Fibroblasts	TOTAL
PAI-1 強度為 2	2 (13 %)	13 (87 %)	15
tPA 強度為 2	14 (93 %)	1 (7 %)	15

二項式分布統計方法：P<0.05

(表九) tPA、PAI-1 表現程度(+cells / 100 個 lymphocyte cells)

tPA、PAI-1 百分量化表現程度

標本編號	t-PA(%)	PAI-1(%)
1	21	0
2	55	0
3	85	0
4	49	0
5	58	0
6	61	70
7	53	71
8	20	0
9	59	81
10	61	73
11	48	82
12	85	65
13	43	0
14	78	84
15	46	83
16	89	81
17	86	66
18	44	79
19	43	0
20	42	71
21	22	0
22	41	0
23	84	0
24	89	0
25	39	0
26	88	88
27	25	0
28	89	62
29	38	75
30	39	74

p>0.05