

# 不同质量浓度阿仑膦酸钠干预牙槽骨吸收模型兔牙周组织破骨细胞分化因子和骨保护素的表达★

施健<sup>1</sup>, 张健<sup>2</sup>

## Expression of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand/osteoprotegerin in periodontal tissues in rabbits with periodontitis in response to alendronate

Shi Jian<sup>1</sup>, Zhang Jian<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Orthodontics, Second Affiliated Hospital, Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China;  
<sup>2</sup>Tianjin Medical University, Tianjin 300000, China

Shi Jian★, Master, Department of Orthodontics, Second Affiliated Hospital, Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China  
beidasj@163.com

Received: 2010-12-03  
Accepted: 2011-04-11

### Abstract

**BACKGROUND:** Studies have shown that alendronate can prevent and treat osteoporosis, but there are few reports about alendronate application for alveolar bone absorption.

**OBJECTIVE:** To build an animal model of alveolar bone absorption so as to evaluate the expression of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL)/osteoprotegerin (OPG) expression in periodontal tissues with periodontitis in response to different concentrations of alendronate.

**METHODS:** Rabbit models were divided into five groups: collagen+0.5 g/L alendronate group, collagen+1 g/L alendronate group, collagen+2 g/L alendronate group, collagen group and control group. The expression of RANKL and OPG in the periodontal tissues was detected with immunohistochemistry method.

**RESULTS AND CONCLUSION:** RANKL and OPG were localized in osteoblasts, osteoclasts and fibroblasts. RANKL/OPG ratio in the control and collagen groups was significantly greater than that in the other three groups ( $P < 0.05$ ). RANKL/OPG ratio in the collagen+1 g/L alendronate group was higher than that in the collagen+0.5 g/L alendronate group at 2 and 4 weeks after medication ( $P < 0.05$ ). The results indicated that alendronate, especially at a concentration of 1 g/L could decrease RANKL/OPG ratio and inhibit alendronate alveolar bone absorption.

Shi J, Zhang J. Expression of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand/osteoprotegerin in periodontal tissues in rabbits with periodontitis in response to alendronate. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(20): 3666-3669. [http://www.crter.cn http://en.zgckf.com]

### 摘要

**背景:** 有研究表明阿仑膦酸钠能够防治骨质疏松症,但其应用到口腔牙周组织干预牙槽骨吸收较为罕见。

**目的:** 建立兔牙槽骨吸收模型,观察不同质量浓度阿仑膦酸钠干预下炎症牙周组织破骨细胞分化因子和骨保护素的表达。

**方法:** 将大耳白兔建立牙槽骨吸收模型,建模成功后随机分成5组,胶原+0.5 g/L阿仑膦酸钠组、胶原+1 g/L阿仑膦酸钠组、胶原+2 g/L阿仑膦酸钠组、胶原组、对照组。各组分别于用药后2和4周用免疫组织化学方法检测破骨细胞分化因子和骨保护素表达情况,并进行药效评价。

**结果与结论:** 破骨细胞分化因子和骨保护素阳性细胞在5组成骨细胞、破骨细胞、成纤维细胞中均有表达,胞浆呈棕色或棕褐色颗粒状着色。对照组和胶原组牙槽骨吸收区破骨细胞分化因子和骨保护素比率明显大于其他3组( $P < 0.05$ ),胶原+1 g/L阿仑膦酸钠组在用药后2和4周均高于胶原+0.5 g/L阿仑膦酸钠组( $P < 0.05$ )。结果证实,阿仑膦酸钠能够降低牙槽骨破骨细胞分化因子和骨保护素的比率,应用含1 g/L阿仑膦酸钠胶原海绵载体更适合抑制牙槽骨吸收。

**关键词:** 阿仑膦酸钠;破骨细胞分化因子;骨保护素;骨组织构建;兔

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.20.014

施健,张健.不同质量浓度阿仑膦酸钠干预牙槽骨吸收模型兔牙周组织破骨细胞分化因子和骨保护素的表达[J].中国组织工程研究与临床康复,2011,15(20):3666-3669. [http://www.crter.org http://cn.zgckf.com]

<sup>1</sup> 辽宁医学院附属第二医院口腔正畸科,辽宁省锦州市121000;  
<sup>2</sup> 天津医科大学,天津市300000

第一作者和通讯作者:施健★,男,1977年生,汉族,辽宁省锦州市人,2008年辽宁医学院毕业,硕士,主要从事口腔正畸工作。  
beidasj@163.com

中图分类号:R318  
文献标识码:A  
文章编号:1673-8225(2011)20-03666-04

收稿日期:2010-12-03  
修回日期:2011-04-11  
(201012030080/WJ·W)

## 0 引言

阿仑膦酸钠是第3代的二膦酸盐,它具有强力抑制骨吸收、防止骨丢失、增加骨量等调节骨代谢作用。牙周炎是口腔常见疾病,牙槽骨吸收是其主要病理变化,易致牙松动或脱落。破骨细胞分化因子(receptor or activator of NF-KB ligand, RANKL)和骨保护素(osteoprotegerin, OPG)为调节骨代谢的核心因子和最终效应系统,此两者表达量的相对比值决定着骨代谢的方向和骨吸收的程度,两者

比值上升骨吸收增加,而两者比值降低则骨吸收抑制<sup>[1]</sup>。阿仑膦酸钠可以调节成骨细胞分泌各种细胞因子间接地抑制骨吸收,目前阿仑膦酸钠对牙槽骨吸收区RANKL和OPG的影响研究较少,实验通过牙槽骨吸收实验动物模型,探索不同浓度阿仑膦酸钠对实验性牙周炎牙槽骨吸收的局部辅助性药物治疗作用及对RANKL和OPG及两者比值的影响。

## 1 材料和方法

设计:随机对照动物实验。

**时间及地点:** 于2010-06/09在辽宁医学院实验室完成。

**材料:**

**实验动物:** 选用20只出生后150~180 d健康大耳白兔, 雌雄不限, 体质量2.2~3.0 kg, 由辽宁医学院动物中心提供。动物许可证号: SCXK(辽)2003-0007。

**主要试剂及仪器:**

试剂及仪器	来源
阿仑膦酸钠, I 型胶原 RANKL, OPG 的 SABC 免疫组织化学试剂盒	石家庄制药公司 武汉博士德生物公司
组织切片机	德国 LEICA 公司

**实验方法:**

**牙槽骨吸收模型的建立:** 全部兔全身麻醉, 用0.25 mm 结扎丝环绕第一磨牙牙颈部结扎。喂软食并以高浓度糖水喂食10 d。牙周炎形成后将含药胶原海绵载体塞入用药组兔患牙的牙周袋内, 最后牙龈缝合。兔分别于植入药物后的2和4周采用耳缘静脉空气栓塞法处死各组动物, 迅速游离下颌骨, 将标本放入40 g/L多聚甲醛溶液中(4 ℃)24 h外固定<sup>[2-3]</sup>。兔牙槽骨出现Howship陷窝、骨密度下降, 牙槽骨高度降低即为建模成功。

**分组及干预:** 实验动物适应性静养1周后, 均建立牙槽骨吸收模型, 去除结扎丝及高糖水后, 随机分为5组, 选择下颌双侧第一磨牙为受试牙, 共40个同名受试牙(每组用药后2周和4周各2只, 4个受试牙)。下颌双侧第一磨牙牙周炎形成后, 胶原+0.5 g/L阿仑膦酸钠组, 胶原+1 g/L阿仑膦酸钠组, 胶原+2 g/L阿仑膦酸钠组于牙周分别植入含0.5, 1, 2 g/L阿仑膦酸钠的I型胶原海绵载体。胶原组牙周植入不含阿仑膦酸钠的胶原海绵, 对照组牙周不植入任何药物, 每组4只。

**免疫组织化学检测:** 取全部实验动物下颌骨修剪成约2 cm长的包括下颌第一磨牙的整段下颌骨, 经固定、脱钙, 流水冲洗过夜, 脱水, 石蜡包埋, 沿颌骨及牙长轴矢状切片制作5 μm厚石蜡切片。按RANKL和OPG两组分别采用各自的SABC免疫组织化学试剂盒进行免疫组织化学染色, 一抗采用鼠抗兔RANKL多克隆抗体和鼠抗兔OPG多克隆抗体, 抗体滴度1:100, 二抗采用羊抗鼠多克隆抗体。应用CIAS-1000细胞图像分析系统按各组的不同时间段随机选取经免疫组织化学染色的切片RANKL组和OPG组各5张, 在每张切片的下颌第一磨牙牙槽骨吸收区的阳性着色的细胞处分别随机选取5个不重复、不重叠的高倍视野按RANKL组和OPG组分别分析RANKL和OPG表达的阳性细胞数。

$$\text{RANKL/OPG 比值} = \frac{\text{RANKL 阳性细胞数}}{\text{OPG 阳性细胞数}}$$

**结果判定:** 阳性染色为细胞胞浆内有棕黄色颗粒, 随

机选取10个高倍视野(×400), 计算阳性细胞数百分比, 阳性细胞数 < 5% 为阴性(-), 阳性细胞数5%~25% 为(+), 25%~70%为(++), > 70%为强阳性(+++)。

**主要观察指标:** 各组RANKL/OPG比值。

**统计学分析:** 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用SPSS 13.0 统计学软件进行数据分析, 组间数据差异比较采用单因素方差分析法,  $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

**2 结果**

**2.1 实验动物数量分析** 大耳白兔20只均进入结果分析, 无死亡和感染, 无脱落。

**2.2 RANKL和OPG在牙周组织的表达** 应用阿仑膦酸钠干预的大鼠牙周组织RANKL弱阳性表达, 仅表达在少量破骨细胞、成骨细胞及成纤维细胞胞浆中。破骨细胞少见, 可见部分成骨细胞, OPG在成骨细胞及其前体细胞、牙周膜成纤维细胞胞浆中呈阳性染色。其中胶原+0.5 g/L阿仑膦酸钠组和胶原+1 g/L阿仑膦酸钠组表达的较多。用药2周胶原+1 g/L阿仑膦酸钠组RANKL弱阳性染色, 见图1(其余时间点图片未展示)。

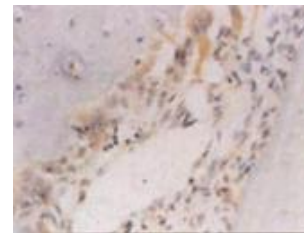


Figure 1 Collagen+1 g/L alendronate group at 2 wk after medication: weak-positive expression of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) (Immunohistochemistry staining, ×400)  
图1 胶原+1 g/L阿仑膦酸钠组用药2周 RANKL弱阳性染色(免疫组织化学染色, ×400)

用药4周胶原+0.5 g/L阿仑膦酸钠组RANKL呈弱阳性染色。用药2周胶原+1 g/L阿仑膦酸钠组OPG阳性染色, 用药4周胶原+1 g/L阿仑膦酸钠组OPG阳性染色, 见图2。

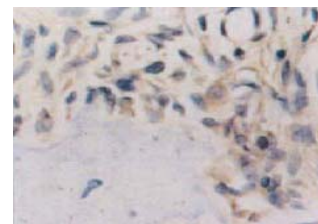


Figure 2 Collagen+1 g/L alendronate group at 4 wk after medication: positive expression of osteoprotegerin (OPG) (Immunohistochemistry staining, ×400)  
图2 胶原+1 g/L阿仑膦酸钠组4周 OPG阳性染色(免疫组织化学染色, ×400)

用药4周胶原+2 g/L阿仑膦酸钠组OPG阳性染色, 见图3。

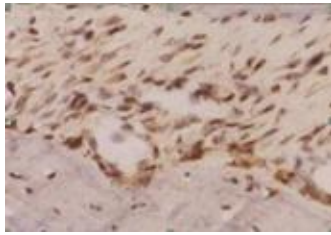


Figure 3 Collagen+2 g/L alendronate group at 4 wk after medication: positive expression of osteoprotegerin (OPG) (Immunohistochemistry staining, ×400)  
图3 胶原+2 g/L阿仑膦酸钠组4周OPG阳性染色(免疫组织化学染色, ×400)

未用阿仑膦酸钠干预的大鼠牙周组织中RANKL在牙槽嵴顶破骨细胞表达最强, 以及骨边缘的成骨细胞及成纤维细胞中均出现胞浆阳性, OPG表达的有限很微弱, 靠近牙槽嵴顶的成骨细胞及成纤维细胞的胞浆中有较强的阳性表达。胶原组牙槽骨吸收模型建立2周后RANKL强阳性染色, 对照组牙槽骨吸收模型建立2周后RANKL阳性染色, 见图4。对照组牙槽骨吸收模型建立4周后RANKL呈阳性染色(其余时间点图片未展示)。

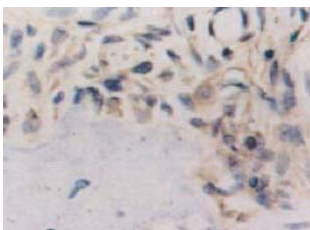


Figure 4 Control group at 2 wk after medication: positive expression of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) (Immunohistochemistry staining, ×400)  
图4 对照组2周RANKL阳性染色(免疫组织化学染色, ×400)

2.2 不同时间段各组RANKL和OPG阳性细胞百分率比值统计结果 不同时间段各组RANKL和OPG阳性细胞百分率比值统计结果见表1。

表1 各组牙槽骨吸收区 RANKL/OPG 比值变化  
Table 1 RANKL/OPG ratios in each group (x±s, n=5, %)

Group	Time after medication (wk)	
	2	4
Collagen+0.5 g/L alendronate	1.19±0.39 <sup>a</sup>	1.21±0.43 <sup>a</sup>
Collagen+1 g/L alendronate	0.61±0.22 <sup>ab</sup>	0.65±0.32 <sup>ab</sup>
Collagen+2 g/L alendronate	0.63±0.11 <sup>a</sup>	0.68±0.25 <sup>a</sup>
Collagen	2.53±0.36	2.40±0.22
Control	2.40±0.41	2.36±0.29

RANKL/OPG: receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand /osteoprotegerin, <sup>a</sup>P < 0.05, vs. control and collagen groups; <sup>b</sup>P < 0.05, vs. collagen+0.5 g/L alendronate group

对照组和胶原组牙槽骨吸收区RANKL/OPG比率明显大于其他3组(P < 0.05), 在同一时间下, 应用含1 g/L阿仑膦酸钠I型胶原海绵载体组较应用含0.5 g/L阿仑膦酸钠I型胶原海绵载体组更为适合抑制牙槽骨吸收(P < 0.05)。

### 3 讨论

建立稳定、可靠的实验性牙槽骨吸收动物模型, 有助于了解牙周炎的初起和进展机制, 是药物研究的重要条件之一<sup>[4-5]</sup>。钢丝结扎为主的多因素致牙周炎法是目前最常用的实验动物牙周炎建模方法<sup>[3, 6]</sup>。实验通过在兔下颌第一磨牙颈部结扎正畸结扎丝同时喂食高糖水诱导牙周炎形成, 其机制在于用丝线结扎时对牙龈有机械创伤, 同时丝线的存在对牙龈不仅是一种异物刺激, 还可增加菌斑的积聚。喂高糖软食, 有利于食物在局部沉积, 促进细菌繁殖, 使其在局部的聚集加重。

有研究认为二膦酸盐除了抑制破骨细胞的活性外, 还作用于细胞因子<sup>[7]</sup>, 从而减少破骨细胞活化, 阻断骨吸收过程。Pan等<sup>[8]</sup>研究发现, 含氮二膦酸盐唑来磷酸不仅可增加骨保护素的基因表达, 且可减少RANKL的基因表达, 同样使RANKL/OPG比率明显降低。

实验在牙槽骨吸收区局部用药并改以往实验的促骨增生为抑制骨吸收, 且同时对RANKL和OPG两项指标比值进行检测分析。两者是多种上游细胞因子调控活性破骨细胞的最终效应系统。骨组织微环境中RANKL与OPG比例的变化, 最终调节破骨细胞的分化、激活和凋亡, RANKL/OPG比率的降低在骨吸收中发挥着重要作用<sup>[9]</sup>。

实验结果显示, 在用药后的不同时期, 牙槽骨吸收区的成骨细胞中均存在OPG的表达, OPG在成骨细胞及其前体细胞胞浆中呈阳性染色, 其中胶原+0.5 g/L阿仑膦酸钠组和胶原+1 g/L阿仑膦酸钠表达的较多, RANKL仅表达在少量破骨细胞、成骨细胞及成纤维细胞胞浆中, 使RANKL/OPG比率明显降低。而未用药的两组RANKL在牙槽嵴顶破骨细胞表达最强, 以及骨边缘的成骨细胞、成纤维细胞中均出现胞浆阳性, OPG表达的影响有限, 靠近牙槽嵴顶的成骨细胞及成纤维细胞的胞浆中有较强的阳性表达, 使RANKL/OPG比值明显升高, 阿仑膦酸钠可通过影响RANKL/OPG比值而调节骨吸收, 从而在预防、抑制牙槽骨吸收中发挥作用。阿仑膦酸钠对牙槽骨吸收的抑制作用有一定浓度的浓度依赖性, 不仅可进入破骨细胞直接抑制破骨细胞内的信号传导, 干扰其骨吸收作用, 而且可通过调节成骨细胞分泌各种细胞因子间接地抑制破骨细胞的骨吸收功能, 从而在预防抑制牙槽骨吸收中发挥作用。

本次实验中由于条件所限只设计了3个浓度组, 结

果表明含 1 g/L 阿仑膦酸钠 I 型胶原海绵载体浓度组抑制骨吸收在用药后 2 周即可收到明显效果。因此, 根据本实验结果, 应用含 1 g/L 阿仑膦酸钠 I 型胶原海绵载体组较应用含 0.5 g/L 阿仑膦酸钠 I 型胶原海绵载体组更为适合抑制牙槽骨吸收。

#### 4 参考文献

[1] Dereka XE, Markopoulou CE, Fanourakis G, et al. RANKL and OPG mRNA level after non-surgical periodontal treatment. *Inflammation*. 2010;33(3):200-206.

[2] Ma N, Zhang YL, Zhang L, et al. Baiqien Yike Daxue Xuebao. 2001;27(6):611-613  
马宁, 张颖丽, 张莉, 等. 牙周炎动物模型的研究[J]. 白求恩医科大学学报, 2001, 27(6): 611-613.

[3] Kim CS, Choi SH, Cho KS, et al. Periodontal healing in one-wall intra-bony defects in dogs following implantation of autogenous bone or a coral-derived biomaterial. *J Clin Periodontol*. 2005;32(6):583-589.

[4] Tang Q, Wang RF, Chen LL. Zhejiang Shiyong Yixue. 2008;13(1):11-12.  
唐琪, 王仁飞, 陈莉丽. 实验性牙槽骨吸收动物模型的建立[J]. 浙江实用医学, 2008, 13(1): 11-12.

[5] Chen LL, Tang Q, Yan J. Zhongguo Zhongyao Zazhi. 2004;29(6):549-553.  
陈莉丽, 唐琪, 严杰. 骨碎补提取液对实验性牙槽骨吸收疗效的研究[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(6): 549-553.

[6] Koo KT, Polimeni G, Qahash M, et al. Periodontal repair in dogs: guided tissue regeneration enhances bone formation in sites implanted with a coral-derived calcium carbonate biomaterial. *J Clin Periodontol*. 2005;32(1):104-110.

[7] Lacativa PG, Farias ML. Osteoporosis and inflammation. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2010;54(2):123-132.

[8] Pan B, Farrugia AN, To LB, et al. The nitrogen-containing bisphosphonate, zoledronic acid, influences RANKL expression in human osteoblast-like cells by activating TNF-alpha converting enzyme (TACE). *J Bone Miner Res*. 2004;19(1):147-154.

[9] Pérez-Sayáns M, Somoza-Martín JM, Barros-Angueira F, et al. RANK/RANKL/OPG role in distraction osteogenesis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010;109(5):679-686.

[10] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals. 2006-09-30.

#### 来自本文课题的更多信息--

**作者贡献:** 张健进行实验设计, 实验实施为施健, 实验评估为张健, 资料收集为施健, 施健成文, 张健审校, 施健对文章负责。

**致谢:** 感谢辽宁医学院王稚英院长提供技术性帮助及疾控中心提供的工作方便, 已获得被致谢者本人同意。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家, 相关雇主和其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**伦理批准:** 实验对动物的处理方法符合中华人民共和国科学技术部颁发的《关于善待实验动物的指导性意见》<sup>[10]</sup>。

**本文创新性:** 实验旨在通过兔下颌骨牙槽骨吸收实验动物模型, 在牙周局部应用药物, 并把 RANKL 和 OPG 两者放在一起检测分析, 探索阿仑膦酸钠对实验牙周炎牙槽骨吸收的局部辅助性药物治疗作用。

#### SCI 收录的组织构建类期刊介绍: 本刊发展部

英文刊名: Physical Therapy  
中文刊名: 《物理疗法》  
ISSN: 0031-9023  
影响因子: 2.082  
出版周期: 月刊  
创刊年份: 1921 年  
出版单位 (或出版地): American Physical Therapy Association  
期刊网址: <http://ptjournal.apta.org/>  
主编: Rebecca L. Craik, PT, PhD, FAPTA  
收录数据库: Abridged Index Medicus, Abstracts in Health Care Management Studies, AgeLine, AMED (Allied and Complementary Medicine Database), Bibliography of Developmental Medicine and Child Neurology, Cumulative Index to Nursing and Allied Health Literature (CINAHL), Current Contents, EMBASE/Excerpta Medica, Exceptional Child Education Abstracts, Focus on: Sports Science and Medicine, General Science Index (GSI), Health Index, Hospital and Health Administration Index, Index Medicus, Inpharma Weekly, International Nursing Index, ISR, Medical & Surgical Dermatology, MEDLINE, Neuroscience Citation Index, Personal Alert: Automatic Subject Citation Alert (ASCA), Pharmacoeconomics and Outcomes News, Physical Education Index, Reactions Weekly, RECAL Bibliographic Database, Science Citation Index (SCI), Social Sciences Citation Index (SSCI), and Sports S.

英文简介: *Physical Therapy* (PTJ) engages and inspires an international readership on topics related to physical therapy. As the leading international journal for research in physical therapy and related fields, PTJ publishes innovative and highly relevant content for both clinicians and scientists and uses a variety of interactive approaches to communicate that content, with the expressed purpose of improving patient care. Established in 1921, PTJ has a total circulation of approximately 77 000. Our most recent impact factor was 2.082, and our most recent H-index was 68. The mean time from submission to first decision is 50 days. Time from acceptance to publication online is 2 months or less and from acceptance to publication in print 5 months or less. The acceptance rate is 30%. To make new research readily available to APTA members and subscribers, PTJ publishes all accepted manuscripts ahead of print. These manuscripts have undergone full peer review, copyediting, typesetting, and the first round of proofreading. The final versions of these papers will appear in a future print and online issue of PTJ.  
中文简介: 《物理疗法》杂志关注全世界最新的关于物理治疗的研究。为了让美国物理治疗协会会员和投稿人更早的读到文章, 所有的可发的文章都会提前在网站上出版。