

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.42.012 [http://www.crter.org/crter-2012-qikanquanwen.html]
金珊丹, 郑嵘, 吴立鹏, 杨东红. 葛根素在兔牙周组织改建中的作用[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(42): 7853-7856.

葛根素在兔牙周组织改建中的作用★

金珊丹, 郑 嵘, 吴立鹏, 杨东红

文章亮点: 提示葛根素可能在保持期通过上调骨形态发生蛋白2的表达而促进成骨细胞抑制破骨细胞从而缩短保持期时间。

关键词: 葛根素; 正畸保持期; 骨形态发生蛋白2; 成骨细胞; 破骨细胞; 组织构建

缩略语: 骨形态发生蛋白2: bone morphogenetic protein-2, BMP-2

摘要

背景: 研究发现葛根素对体外骨形成具有一定的促进作用。

目的: 葛根素在牙周组织改建中的作用。

方法: 33只兔随机分成空白对照组3只、阴性对照组15只和实验组15只。给兔双侧下颌第1磨牙安装加力装置, 均加力14d结束后, 安装保持器装置, 保持期对照组耳缘静脉注射生理盐水, 实验组给予葛根素注射液。分别于加力保持1, 3, 7, 14, 21d, 每个时间点各处死3只, 取组织标本。

结果与结论: 实验组: 第1天远中侧可见新骨形成, 边缘有成骨细胞, 近中侧可见较多的破骨细胞; 第14, 21天近远中侧均明显的新骨堆积, 致密的骨小梁形成。阴性对照组: 第1天组与实验组类似; 第14天近远中侧均有新骨形成, 未见完全钙化的类骨质, 骨吸收陷窝消失, 表面见成骨细胞; 第21天近远中侧均见大量新骨形成。与阴性对照组比较, 各时间点实验组骨形态发生蛋白2的表达量高于阴性对照组, 第7, 14, 21天两组表达量差异有显著性意义($P < 0.05$)。实验组骨形态发生蛋白2的表达呈逐渐增强的趋势, 阴性对照组骨形态发生蛋白2的表达呈逐渐减少的趋势。实验组与阴性对照组骨形态发生蛋白2的表达均强于空白对照组($P < 0.05$)。提示葛根素可能在保持期通过上调骨形态发生蛋白2的表达而促进成骨细胞抑制破骨细胞从而缩短保持期时间。

佳木斯大学附属
口腔医院, 黑龙江
省佳木斯市
154002

金珊丹★, 女,
1982年生, 黑龙
江省拜泉县人, 汉
族, 2012年佳木
斯大学口腔医学
院毕业, 硕士, 主
要从事口腔正畸
研究。
Gzcsjd0606@
163.com

通讯作者: 吴立
鹏, 教授, 佳木斯
大学附属口腔医
院, 黑龙江省佳木
斯市 154002

中图分类号: R318
文献标识码: A
文章编号: 2095-4344
(2012)42-07853-04

收稿日期: 2012-03-21
修回日期: 2012-04-09
(20111121010/W·T)

Effect of puerarin on rabbit periodontal tissue remodeling

Jin Shan-dan, Zheng Rong, Wu Li-peng, Yang Dong-hong

Abstract

BACKGROUND: Several studies have shown that puerarin has promoting effect on bone formation *in vitro*.

OBJECTIVE: To investigate the effect of puerarin on rabbit periodontal tissue remodeling.

METHODS: Totally 33 rabbits were randomly divided into the blank control group (three rabbits), the negative control group (15 rabbits) and the experimental group (15 rabbits). Rabbits' bilateral mandibular first molars were installed stressing device, and after 14 days, the rabbits were installed retainer device. During retention period, the rabbits in the control group were injected normal saline, while the rabbits in the experimental group were injected puerarin. The two groups were maintained for 1, 3, 7, 14 and 21 days, respectively. Three rabbits were killed at each time point and their tissue samples were extracted.

RESULTS AND CONCLUSION: In the experimental group: new bone formed in the far side, and there were osteoblasts at the verge, in addition, more osteoclasts were found in the near side at first day; at days 14 and 21, obvious accumulation of new bone was found in the near and far side, and dense trabecular bone formed. In the negative control group: at first day, it was similar to the experimental group; at day 14, there were new bones formed in the near and far side, and completely calcified osteoid was not be seen, besides, lacunar resorption disappeared, and osteoblasts were found on the surface; at day 21, a number of new bones formed in the near and far side. Compared with the negative control group, bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) expression of the experimental group was higher at each time point. The express levels between the two groups at days 7, 14 and 21 had significant difference ($P < 0.05$). The BMP-2 expression of the experimental group was increased gradually, while that of the negative control group was decreased gradually. The BMP-2 expression of the experimental group and negative control group were both higher than that of the blank control group ($P < 0.05$). These results suggest that puerarin may promote osteoblast and inhibit osteoclast so as to shorten the retention period through the up-regulation of BMP-2 expression in retention period.

Jin SD, Zheng R, Wu LP, Yang DH. Effect of puerarin on rabbit periodontal tissue remodeling. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(42): 7853-7856.

Affiliated
Stomatological
Hospital of Jiamusi
University, Jiamusi
154002, Heilongjiang
Province, China

Jin Shan-dan,
Master, Affiliated
Stomatological
Hospital of Jiamusi
University, Jiamusi
154002, Heilongjiang
Province, China
Gzcsjd0606@
163.com

Corresponding
author: Wu Li-peng,
Professor, Affiliated
Stomatological
Hospital of Jiamusi
University, Jiamusi
154002, Heilongjiang
Province, China

Received: 2012-03-21
Accepted: 2012-04-09

0 引言

葛根素是豆科植物野葛或其葛藤白干燥根中提取出的一种黄酮苷, 化学名为4', 7-二羟基-8-D-葡萄糖基异黄酮; 作为改善心脑血管循环的新药, 1993年获卫生部批准用于临床。李斌斌等^[1]采用体外培养分别观察了葛根素对成骨细胞和破骨细胞的作用, 发现葛根素对体外骨形成具有一定的促进作用。但其具体作用机制并不明确。本实验通过观察葛根素对正畸牙保持期牙周组织中骨形态发生蛋白2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2)表达的影响, 讨论葛根素对缩短正畸牙保持期的可能机制。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 实验于2011年4至11月在佳木斯大学动物中心及佳木斯大学基础医学院病理科完成。

材料: 3月龄雄性家兔33只, 体质量(2.0±0.2) kg, 由佳木斯大学动物实验中心提供。许可证号: SCXK(黑2010002)。

试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
光学显微镜	日本 Olympus
YL3-A 型回转式切片机	上海仪表厂
HPIAS-1000 高清晰度彩色病理图文分析系统	中西远大科技有限公司
Image-ProPlus6.0 软件	美国 Media Cybernetics 公司
葛根素注射液 (批号 110715-200292)	北京四环制药公司
BMP-2 抗体	武汉博士德生物工程有限公司

方法:

实验动物的分组与处理: 兔33只, 分笼饲养, 提供兔专用饲料、清水, 使其自由进食饮水。33只兔随机分成11个小组。①空白对照组: 3只, 不做任何处置。②阴性对照组: 15只, 双侧下颌第1磨牙安装加力装置, 分5个小组即保持1, 3, 7, 14, 21 d, 每组3只, 加力14d结束后, 安装保持期装置, 保持期给予生理盐水。③实验组: 15只, 双侧下颌第1磨牙安装加力装置, 分5个小组即保持1, 3, 7, 14, 21 d, 每组3只, 加力14d结束后, 同样安装保持器装置, 保持期给予葛根素注射液。

建立正畸牙移动动物模型: 以兔前牙为支抗, 牵引下

颌第1磨牙向近中移动, 力值80 g^[2], 持续14 d。20 g/L戊巴比妥钠(2 mL/kg)麻醉后将兔仰卧固定在手术台上, 用牙科手机在兔双侧下颌切牙龈缘处作一深约0.5 mm的固位沟, 用0.25 mm正畸不锈钢结扎丝将螺旋弹簧结扎在下颌切牙与第1磨牙之间, 用测力计测量使螺旋弹簧产生80 g的拉力, 牵引下颌第1磨牙向近中移动, 每日检查装置是否脱落或损坏, 如有则及时补救。

建立正畸牙保持期动物模型^[3]: 阴性对照组和实验组在正畸加力14 d后, 兔全麻状态下, 去除加力装置, 安装保持装置, 即用0.25 mm正畸用不锈钢结扎丝连扎第1磨牙和两颗中切牙, 分别保持1, 3, 7, 14, 21 d, 其间每天检查保持装置是否脱落、损坏或兔切牙是否明显萌长, 如有则及时补救。

给药方法^[4-5]: 阴性对照组于保持开始的前1天耳缘静脉注射生理盐水, 50 mg/kg, 隔日1次, 直至处死。实验组于保持开始的前1天耳缘静脉注射葛根素注射液, 50 mg/kg, 隔日1次, 直至处死。

苏木精-伊红染色、免疫组织化学染色: 于给药1, 3, 7, 14, 21 d将动物处死, 取双侧第1磨牙及其周围牙槽骨的骨组织块40 g/L多聚甲醛固定, 10%EDTA脱钙2个月。切片常规脱蜡至水。二甲苯 I、II 脱蜡各15 min; 体积分数100%乙醇 I、II 各5 min。0.3%甲醇-过氧化氢室温10 min以灭活内源性酶。各级乙醇脱水5 min; 蒸馏水洗5 min 2次。将切片滴加复合消化液振荡洗5 min 2次。所有切片滴加5%BSA封闭液, 37 °C 孵育20 min。甩去多余液体, 不洗。滴加适当稀释的一抗, 4 °C 冰箱过夜, 次日取出湿盒, 恢复室温, 0.1 mol/L PBS 振荡洗5 min×3次。滴加二抗, 37 °C 孵育20 min, 0.1 mol/L PBS振荡洗5 min×3次。滴加SABC, 37 °C 孵育30 min, 0.1 mol/L PBS振荡洗5 min×4次。DAB显色, 使用DAB显色试剂盒, 取1 mL蒸馏水, 加试剂盒中A, B, C, 试剂各1滴, 混匀后加至切片, 室温显色, 镜下控制反应时间, 显色后蒸馏水洗净。苏木精轻度复染, 自来水洗; 自来水蓝化一两个小时。各级乙醇脱水, 二甲苯透明, 根据要求中性树胶, 显微镜观察。

BMP-2的灰度值^[6]: 利用图像分析系统(HPIAS-100高清晰度彩色病理图文件分析系统), 随机选5张免疫组织化学染色的切片做灰度值分析。在组织切片上确定远中侧(保持期的压力区)的牙周膜的近牙骨质侧。随机选择3个视野, 检测各组标本平均灰度值。

主要观察指标: ①实验组和阴性对照组成骨细胞及破骨细胞及新骨形成。②牙周组织中BMP-2表达。

统计学分析: 所有数据采用Image-ProPlus 6.0软件进行数据处理, 采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 实验选用兔33只, 分为3组, 无脱失, 全部进入结果分析。

2.2 实验组和阴性对照组正畸牙保持期苏木精-伊红染色结果

实验组: 第1天远中侧可见新骨形成, 边缘有成骨细胞, 近中侧呈不规则的虫蚀状, 可见较多的破骨细胞; 第3天远中侧可见明显的新骨形成, 近中侧也出现新骨形成, 可见少量破骨细胞; 第7天组远中侧疏松的骨小梁形成, 近中侧成骨为主, 偶尔见破骨细胞; 第14天近远中侧均明显的新骨堆积, 致密的骨小梁形成, 见图1; 第21天与14天组类似。

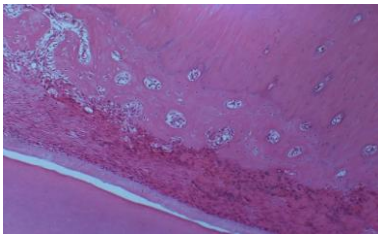


Figure 1 Hematoxylin-eosin staining results of the experimental group at 14 d (x200)
图1 实验组 14 d 苏木精-伊红染色结果(x200)

阴性对照组: 第1天组与实验组类似; 第3天远中侧见新骨形成, 近中侧见较多的骨吸收陷窝及破骨细胞; 第7天组远中侧见明显的新骨形成, 可见成骨细胞与破骨细胞, 近中侧见骨吸收陷窝中有成骨细胞; 第14天近远中侧均有新骨形成, 见未完全钙化的类骨质, 骨吸收陷窝消失, 表面见成骨细胞, 见图2; 第21天近远中侧均见大量新骨形成。

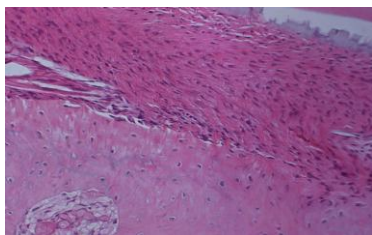


Figure 2 Hematoxylin-eosin staining results of the control group at 14 d (x200)
图2 对照组 14 d 苏木精-伊红染色结果(x200)

2.3 牙周组织中BMP-2免疫组织化学结果 BMP-2表达阳性的细胞有成纤维细胞、成骨细胞、破骨细胞, 主要位于细胞的胞浆中, 为棕黄色颗粒, 见图3, 4。

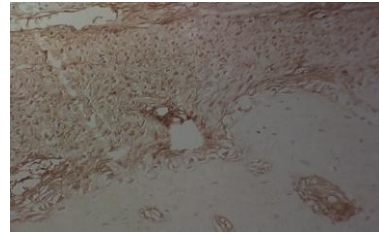


Figure 3 Immunohistochemical staining results of the control group at 7 d (x400)
图3 对照组 7 d 免疫组织化学染色结果(x400)

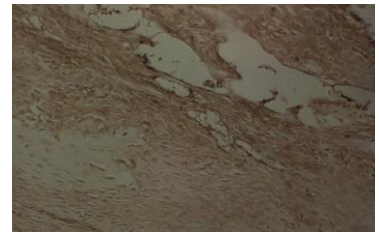


Figure 4 Immunohistochemical staining results of the experimental group at 14 d (x400)
图4 实验组 14 d 免疫组织化学染色结果(x400)

由表1所示, 相同时间的实验组与阴性对照组比较, 实验组BMP-2的表达量高于阴性对照组; 实验组与阴性对照组中, 第1天组与第3天组BMP-2的表达量差异无显著性意义($P > 0.05$), 第7, 14, 21天BMP-2的表达量差异有显著性意义($P < 0.05$)。在表达强度上, 实验组BMP-2的表达呈逐渐增强的趋势; 阴性对照组BMP-2的表达呈逐渐减少的趋势。实验组与阴性对照组BMP-2的表达均强于空白对照组($P < 0.05$)。

表1 移动牙牙周组织压力侧骨形态发生蛋白2的灰度值表达
Table 1 Gray value of bone morphogenetic protein-2 in the pressure side of periodontal tissue with tooth movement ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Time (d)	Experimental group	Negative control group
0	144.62±3.82	144.62±3.82
1	156.91±3.16 ^a	155.63±2.73 ^a
3	157.95±3.17 ^a	155.58±2.82 ^a
7	160.04±3.22 ^{ab}	152.83±2.29 ^a
14	163.11±3.13 ^{ab}	150.28±1.96 ^a
21	164.40±3.05 ^{ab}	147.59±2.08 ^a

^a $P < 0.05$, vs. blank control group; ^b $P < 0.05$, vs. negative control group

3 讨论

正畸治疗时间长的问题是困扰国内外正畸学界的

一个难题,为了缩短时间,促进牙齿尽早的稳定在矫治后的位置上,正畸医生作出了许多努力,所以缩短治疗时间成为医患的共同要求,本实验即探讨中药缩短正畸牙齿的保持时间的一种方法。

葛根素作为从葛根中提取物,其结构类似雌二醇,具有某些雌激素样作用被称为植物雌激素^[7]。近年来,发现其具有良好的扩张冠状动脉、抗心肌缺血、抗血小板凝聚和保护血管的作用,类似于活血化瘀中药的作用^[8]。

本实验推论葛根素能缩短保持时间原因可能有以下两方面:①增强牙周血管的血液循环,促使牙周原始细胞向成骨细胞转化^[9];成骨细胞来自多潜能的间充质细胞,负责骨基质形成及钙化^[10]。BMP-2 主要由未分化的间充质细胞和成纤维细胞等结缔组织细胞分泌^[11],在局部释放,激活间充质细胞从组织胚胎遗传下来的软骨-骨的形态发生潜能,许多试验都证明了BMP-2有促进成骨细胞分化诱导成骨的作用^[12],从而推断葛根素可通过上调BMP-2的表达而促进成骨细胞分化进而加速骨的形成,达到缩短时间的目的,但具体机制尚不清楚。②葛根素能够抑制破骨细胞性骨吸收,减少骨吸收陷窝数目和面积^[13],破骨细胞前体细胞膜表面的核因子κB受体激活因子是前体细胞被激活和分化成破骨细胞最重要的信号通道,而成骨细胞分泌的核因子κB受体激活因子配体激活该通道。同时,成骨细胞也分泌核因子κB受体激活因子配体的可溶性受体骨保护素,从而与核因子κB受体激活因子配体竞争性结合并阻断其与核因子κB受体激活因子的结合,起到抑制破骨细胞生成和活化作用^[14-15];即葛根素可通过上调BMP-2的表达而促进成骨细胞分泌骨保护素,骨保护素与核因子κB受体激活因子配体竞争性结合并阻断其与核因子κB受体激活因子的结合,起到抑制破骨细胞生成的作用,但具体葛根素是怎样调节BMP-2的表达尚未见报道,还有待于研究。

4 参考文献

- [1] Li BB, Yu SF. Beijing Daxue Xuebao: Yixueban. 2003;35(1):74. 李斌斌,于世凤. 葛根素调控骨代谢的体外实验研究[J]. 北京大学学报:医学版,2003,35(1):74.
- [2] Burstone CJ, Groves MH. Threshold and optimum force values for maxillary anterior tooth movement. Dent Res. 1998; 3(9):695.
- [3] Huang Y, Wang XX, Zhang J, et al. 2007;27(2):64-66. 黄艳,王旭霞,张君,等. 正畸牙移动实验动物模型的建立[J]. 口腔医学,2007,27(2):64-66.
- [4] Yuan LP, Ma LM. Zhongguo Xianyao Zazhi. 2006;16(21): 1738-1740. 袁丽萍,马利敏. 中药注射剂的安全性评价进展[J]. 中国新药杂志, 2006, 16(21): 1738-1740.
- [5] Jin PL, Zhu XY. Zhongguo Yaoli Xuebao. 1992;13(3): 284-288. 金普陆,朱秀媛. 葛根素在大鼠、家兔、犬中的药物动力学[J]. 中国药理学报,1992, 13(3): 284-288.
- [6] Zheng W, Wang BJ, Ye LM. Linchuang yu Shiyang Binglixue Xue Zazhi. 2003;19(5):566-567. 郑伟,汪宝军,叶立民. 灰度值、光学密度值与免疫组织化学片阳性表达强弱的关系[J]. 临床与实验病理学杂志,2003,19(5): 566-567.
- [7] Frost HM. Does bone design intend to minimize fatigue failures? A case for the affirmative. J Bone Miner Metab, 2000;18(5): 278.
- [8] Liu QG, Wang L, Lu ZY, et al. Linchuang Xinxueguanbing Zazhi. 1998;14(5): 292. 刘启功,王琳,陆再英,等. 葛根素抗心肌缺血及其机理的实验研究[J]. 临床心血管病杂志, 1998, 14(5): 292.
- [9] Guiyang Zhongyixueyuan Guzhe Keyan Xiezuozu. Zhonghua Yixue Zazhi. 1978;58(11):67. 贵阳中医学院骨折科研协作组. 中药“接骨 I 号”促进骨折愈合作用的实验观察[J]. 中华医学杂志, 1978, 58(11): 67.
- [10] Chen D, Harris MA, Rossini G, et al. Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) enhances BMP-3, BMP-4, and bone cell differentiation marker gene expression during the induction of mineralized bone matrix formation in cultures of fetal rat calvarial osteoblasts. Calcif Tissue Int. 1997;60(3):283-290.
- [11] Kawai T, Urist MR. Bovine tooth-derived bone morphogenetic protein. J Dent Res. 1989;68(6):1069-1074.
- [12] Marks SN Jr, PoPoff SN. Osteoclast biology in the osteopetrotic (oP) rat. Am J nat. 1989;186(4):325-334.
- [13] Heersche JN, Marcus R, Aurbach GD. Calcitonin and the formation of 3'5'-AMP in bone and kidney. En Doocrinology. 1974;94(1):241-247.
- [14] Theoleyre S, Wittrant Y, Couillaud S, et al. Cellular activity and signaling induced by osteoprotegerin in osteoclasts: involvement of receptor activator of nuclear factor-κB ligand and MAPK. Biochimica et Biophysica Acta. 2004;1644 (1): 1-7.
- [15] Wang R, Zhao JN, Wu SJ. Yixue Yanjiusheng Xuebao. 2006; 19(6): 561-564. 王瑞,赵建宁,吴苏稼. 关节软组织工程修复的支架材料[J]. 医学研究生学报, 2006, 19(6): 561-564.

来自本文课题的更多信息——

作者贡献: 设计、实施、评估均为第一作者。

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

伦理要求: 实验过程中对动物的处置应符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

文章概要: 葛根素可能在保持期通过上调 BMP-2 表达而促进成骨细胞抑制破骨细胞从而缩短保持期时间。

作者声明: 文章为原创作品,数据准确,内容不涉及泄密,无一稿两投,无抄袭,无内容剽窃,无作者署名争议,无与他人课题以及专利技术的争执,内容真实,文责自负。