

丹参酮IIA局部注射正畸牙移动后复发阶段破骨细胞分化因子的表达

张世英¹, 刘继光², 赵刚¹(佳木斯大学, ¹口腔医学院, ²研究生学院, 黑龙江省佳木斯市 154002)

文章亮点:

1 实验首次把丹参酮IIA与正畸牙齿复发联系在一起,过去的一些研究多集中在各种保持装置上,较少将药物与抑制正畸复发联系在一起,国内外没有实验证明丹参酮IIA与抑制正畸复发有确切的关系。
2 本组实验采用局部给药,药物直接作用于牙周组织,使药物更好的发挥效用。结果证明丹参酮IIA在高剂量(1.44 mg/d)时能有效抑制正畸复发。作者从微观角度观察到丹参治疗后成骨细胞形态不规则,胞质内线粒体及粗面内质网明显扩张肿大,表现出旺盛的合成能力。丹参的水溶性提取物丹酚酸B具有增加成骨样细胞碱性磷酸酶的活性,从而可增强成骨样细胞的功能与活性,促进新骨形成。

关键词:

组织构建; 骨组织工程; 丹参酮IIA; 牙移动; 正畸; 抑制复发; 骨保护素; 破骨细胞分化因子

主题词:

丹参; 正畸学; 骨保护素

摘要

背景:近年来,报道了许多药物控制牙齿移动的方法,国内学者将研究方向转向药性相对缓和、不良反应较小的中草药。

目的:观察局部给予不同剂量丹参酮IIA后,大鼠正畸牙齿移动后的复发过程中复发程度、牙周组织中的骨保护素及破骨细胞分化因子的表达。

方法:选用48只雄性Wistar大鼠,随机分成4组,对照组、低、中、高剂量组(分别给予丹参酮IIA 0.36, 0.72, 1.44 mg/d)。以大鼠前牙做支抗牵引其上颌第1磨牙向近中移动。实验组在加力装置去除前1d开始,给予丹参酮IIA局部注射于第1磨牙远中牙龈黏膜,对照组注射生理盐水,1次/d,连续4周。在加力装置去除时及第1,4周测量上颌第1,2磨牙间距离及测量体质量。4周后处死,取上颌第1磨牙及其牙周组织骨保护素、破骨细胞分化因子免疫组织化学染色。

结果与结论:各组大鼠体质量无明显变化。低、中、高剂量组大鼠牙齿移动复发距离小于对照组($P < 0.05$)、复发百分率明显低于对照组($P < 0.05$),且剂量越大复发程度越小,高剂量组复发百分率最低。牙周组织中骨保护素阳性反应灰度积分实验组显著高于对照组($P < 0.05$),破骨细胞分化因子阳性反应灰度积分实验组显著低于对照组($P < 0.05$)。对照组和实验组牙周组织骨保护素/破骨细胞分化因子比率均大于1,高剂量组比率最大。结果表明,丹参酮IIA局部给药对正常大鼠机体体质量变化没有影响,其能有效抑制正畸牙齿移动后的复发程度,在一定范围内,高剂量时效果明显。提示通过调节骨保护素和破骨细胞分化因子的比率来调控破骨细胞,可能是丹参酮IIA加速牙周组织改建的分子机制。

张世英, 刘继光, 赵刚. 丹参酮IIA局部注射正畸牙移动后复发阶段破骨细胞分化因子的表达[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(11):1730-1736.

Tanshinone type IIA inhibits osteoprotegerin and osteoclast differentiation factor expression at relapse stage after orthodontic tooth movement

Zhang Shi-ying¹, Liu Ji-guang², Zhao Gang¹ (¹Jiamusi University School of Stomatology, Jiamusi 154002, Heilongjiang Province, China; ²Jiamusi University Graduate School, Jiamusi 154002, Heilongjiang Province, China)

Abstract

BACKGROUND: In recent years, many drugs emerge to control tooth movement, and scholars in China begin to investigate Chinese herbs with moderate nature and small adverse reaction.

OBJECTIVE: To observe the relapse after orthodontic tooth movement, osteoprotegerin and osteoclast differentiation factor expression in periodontal tissue after rats were treated with local tanshinone type IIA at different doses.

METHODS: A total of 48 male Wistar rats were randomly divided into four groups: control, low dose (tanshinone type IIA 0.36 mg/d), medium dose (tanshinone type IIA 0.72 mg/d), and high dose (tanshinone type IIA 1.44 mg/d) groups. Taking anterior teeth as the anchorage, the maxillary first molar of rats was tracted to mesial movement. In experimental groups, gingival mucosa of the first molar was local injected with tanshinone type IIA 1 day before the force device was removed, while control group was injected with physiological saline, once a day, for 4 weeks. Immediately, 1 week, and 4 weeks after the force device was removed, the distance between the maxillary first molar and second molar was measured and body mass was weighted. The animals were killed after

张世英,女,1981年生,黑龙江省依兰县人,汉族,2009年佳木斯大学毕业,主要从事口腔正畸学研究。

通讯作者:刘继光,博士,教授,佳木斯大学研究生学院,黑龙江省佳木斯市154002

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.11.015
[http://www.crter.org]

中图分类号:R394.2
文献标识码:A
文章编号:2095-4344
(2014)11-01730-07
稿件接受:2014-01-03

Zhang Shi-ying, Jiamusi University School of Stomatology, Jiamusi 154002, Heilongjiang Province, China

Corresponding author: Liu Ji-guang, M.D., Professor, Jiamusi University Graduate School, Jiamusi 154002, Heilongjiang Province, China

Accepted: 2014-01-03

4 weeks, osteoprotegerin and osteoclast differentiation factor expression in maxillary first molar and periodontal tissue were determined using immunohistochemical staining.

RESULTS AND CONCLUSION: There was no obvious change in the body weight of rats in each group ($P > 0.05$). In low, medium and high dose groups, recurrent distance of the teeth was shorter than that in control group ($P < 0.05$), and recurrence percentage was significantly lower than control group ($P < 0.05$). The greater the dose was, the smaller the degree of recurrence was. Osteoprotegerin expression in the periodontal tissue was significantly higher in the experimental groups than the control group ($P < 0.05$), while osteoclast differentiation factor expression was significantly lower than the control group ($P < 0.05$). The ratio of osteoprotegerin/osteoclast differentiation factor in the periodontal tissue was greater than 1 in both control group and experimental groups, and reached the peak in the high dose group. Local delivery of tanshinone type IIA has no impact on body weight of normal rats, and can effectively control the recurrence rate after orthodontic tooth movement. Within a certain range, high dose achieves the most obvious effect. Regulating osteoclast through adjusting the ratio of osteoprotegerin/osteoclast differentiation factor could be the molecular mechanism of tanshinone type IIA accelerating the periodontal tissue rebuilding.

Subject headings: *Salvia miltiorrhiza*; orthodontics; osteoprotegerin

Zhang SY, Liu JG, Zhao G. Tanshinone type IIA inhibits osteoprotegerin and osteoclast differentiation factor expression at relapse stage after orthodontic tooth movement. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(11):1730-1736.

0 引言 Introduction

骨保护素于1997年被外国学者simonet首次发现^[1],该因子是一种经由成骨细胞分泌的分泌型蛋白类,该蛋白属于肿瘤坏死因子受体超家族重要成员并因为它对于破骨细胞分化、成熟等活性抑制的显著作用以及骨密度值正向调节作用而被命名为骨保护素。骨保护素主要通过特异性结合核因子 κ B受体活化因子配体破骨细胞分化因子,竞争性抑制核因子 κ B受体活化因子与破骨细胞分化因子两者之间的特异性结合,从而抑制破骨细胞的分化和活性,进而达到调节骨密度作用^[2]。

近年来,随着人们对正畸的进一步认识,正畸治疗时间长、不利于清洁、影响美观及功能,所以缩短治疗时间成为医患的共同要求,本实验即探讨药物作用下是否可以缩短骨组织修复时间,从而缩短正畸治疗时间^[3]。在正畸临床中,保持矫治后良好的咬合关系,促进移动后的牙齿早日稳定在新的位置上,防止矫正后的牙齿复发非常重要。成人和牙周病患者正畸后常出现保持时间长、易复发的问题,这一直困扰着正畸医生。

在正畸过程中,需要移动的牙齿受到的正畸力将通过牙齿传递到相应的牙周组织,引起牙周组织变化,大致为张力侧牙周组织间隙增宽,胶原纤维和基质增生,成纤维细胞增殖,成骨细胞分化,牙槽骨外壁有新生骨,使牙槽骨保持一定的厚度,而受压侧牙周组织被挤压而使牙周间隙变窄,血管受压,发生循环障碍,出现功能活跃的破骨细胞,牙槽骨内壁发生窝状吸收,骨小梁的排列逐步改造与外力方向一致,为牙齿移动提供间隙;正是通过牙周组织的适应性改建,实现错位牙的移动,最终达到矫治目的。牙周组织改建以牙槽骨的吸收和增生为其生物学基础,促进牙周组织中的骨形成,加速牙周纤维的改建可以使移动后的牙齿尽快稳定在新的位置,并抑制牙齿复发,这对于临床上提高成人正畸保持效果、缩短保持时间以及牙周病患者的正畸治疗具有临床意义^[3]。

为了抑制矫治后复发及缩短保持时间的问题,正畸医生做了大量的努力,如应用物理保持器、邻面去釉、钙离子导入等方法,均对缩短保持期进行了研究;随着药物的发展,许多报道了药物控制牙齿移动的方法,近年来,国内学者将研究方向转向药性相对缓和、不良反应较小的中草药^[4]。作者通过在研究加速牙移动的中药,认为中草药也具有加速新骨形成的作用,使正畸医生认识到中药在临床上巩固正畸治疗效果、缩短保持时间具有重要的临床意义。张丁等^[5-8]在体外状态下,观察丹参对破骨细胞的作用,推测丹参通过改变钙调节蛋白活性对破骨细胞产生影响。根据这个理论作者选取了丹参酮IIA进行实验。实验旨在探讨局部给予丹参酮IIA抑制牙移动复发,促进牙移动后的稳定,缩短保持时间的可行性。

中药丹参为唇形科植物丹参的干燥根及根茎,其始载于《神农本草经》,被列为上品。中医理论认为,丹参性味苦,微寒,归心、肝经,具有祛瘀止痛、活血通经、清心除烦之功效,是中医常用的活血化瘀药。丹参制剂对许多疾病,如冠心病、脑血栓、肝炎、肝硬化等有显著的疗效^[9]。研究表明丹参在心脑血管疾病、癌症等方面具有良好的疗效。丹参的化学成分众多,有二萜醌类,如丹参酮I、IIA、IIB,异丹参酮I、IIA,隐丹参酮,异隐丹参酮,二氢丹参酮I,二氢异丹参酮I等;酚酸类,如丹酚酸A-K,原儿茶醛,丹参素,熊果酸,异阿魏酸等^[10]。有效成分分为脂溶性成分和水溶性成分两大类,丹参酮IIA是丹参中最丰富、结构最具有代表性的丹参酮。其特点是具有临醌或对醌结构,此类化合物易被还原为二酚类衍生物,后者又会被氧化为醌,在转变过程中起电子传递作用,它们在生物体内的代谢产物参与机体的多种生物化学反应,而表现出多种药理作用。

丹参在骨的钙化方面也起着重要的作用,在骨折治疗中应用丹参后成骨细胞在数量及分布部位均较对照侧有明显增多^[5, 11-13]。随着临床上丹参酮IIA的广泛应用,对其药

理作用的研究也相继广泛开展起来,并发现了它还具有很多心血管系统以外的药理活性。实验探讨了其在牙周组织中的作用机制。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 实验于2012年3月至10月在佳木斯大学动物实验中心完成。

材料

实验动物: 选用8周龄健康、雄性Wistar大鼠48只^[15], 体质量为(225±25) g, 佳木斯大学动物中心提供, 许可证号: SCXK(辽)2008-0002。

主要试剂及仪器:

| 试剂及仪器 | 来源 |
|---------------------------------|-------------------|
| 丹参酮IIA磺酸钠注射液 | 上海第一生化药业有限公司 |
| 兔抗鼠骨保护素多克隆抗体、山羊抗大鼠破骨细胞分化因子多克隆抗体 | Santa Cruz 生物技术公司 |
| 免疫组织化学SP超敏试剂盒, 酶底物显色剂DAB | 武汉博士德生物工程有限公司生产 |
| 低温高速离心机 (TOMYGRX-220) | 日本 |
| 恒温水箱 | 北京长安科学仪器厂 |
| 光学显微镜 | 01ympus |

实验方法:

动物模型的建立: 选用8周龄健康、雄性Wistar大鼠48只^[6], 随机分为实验组和对照组, 实验组又分为低剂量组、中剂量组、高剂量组3个亚组, 每组12只大鼠。大鼠自由进食, 饮水。按照King等加力方法建立正畸牙移动动物模型^[14-20], 以大鼠前牙为支抗, 牵引上颌第1磨牙向近中移动, 力约为50 g^[17-18], 持续加力21 d。实验组从加力装置去除前1 d开始进行丹参酮IIA局部注射于第1磨牙远中牙龈黏膜(低剂量组0.36 mg/d、中剂量组0.72 mg/d、高剂量组1.44 mg/d)^[21], 连续给药4周, 对照组注射生理盐水。所有动物于实验开始、给药前及给药后的第1、4周进行测量体质量。

牙齿移动距离测量方法: 在大鼠去除加力装置时及其后4周, 用体积分数10%的水合氯醛(1.0-1.2 mL/kg)麻醉^[22], 制作大鼠个别托盘, 取上颌精确印模, 灌注人工石膏, 修整模型底座, 使其平行于后牙咬合平面, 2个平面间距离1 cm。测量第1磨牙远中沟点与第2磨牙远中沟点的距离, 要求测量由同一人进行3次, 取均值。计算出牙齿移动前后的距离差值, 即牙齿移动复发的距离(mm)。

复发百分率(%)=牙齿复发距离/牙齿移动的总距离×100%。

组织学标本制作: 大鼠用体积分数10%的水合氯醛(1.0-1.2 mL/kg)麻醉, 以40 g/L多聚甲醛溶液心脏灌注,

40 g/L多聚甲醛溶液固定24 h, 10%EDTA溶液常规脱钙, 石蜡包埋。以平行牙体长轴为标本作近远中向连续组织切片11张, 切片厚度为5 μm, 将第1, 4, 7, 10张切片取出, 行苏木精-伊红染色, 在光镜下观察。并进行免疫组织化学染色。

组织学观察及图像分析: 每个免疫组织化学染色标本选取3张切片, 光镜下对比观察对照组、实验组的免疫组织化学染色的分布及变化规律, 在牙周组织中的表达情况。每张切片的压力区和张力区分别随机选取5个视野检测分析, 实验检测结果经计算机图像分析系统处理, 计算各切片阳性反应的灰度值。具体操作为在低倍镜下寻找视野后, 调至400×, 自动控制装置随机选取5个视野测量阳性产物强度灰度值。结果为透光度, 阳性强度灰度值=250-透光度。然后将上述数值转化成灰度积分: 灰度积分=阳性产物面积/测量面积×阳性强度灰度值。

主要观察指标: ①大鼠实验前后体质量的变化。②大鼠给药后牙齿移动后复发比率。③牙周膜中骨保护素染色的图像分析结果。④牙周膜中破骨细胞因子染色的图像分析结果。⑤牙周膜中骨保护素/破骨细胞因子比率分析结果。

统计学分析: 采用SPSS 17.0软件进行数据处理, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用方差分析, 实验组和对照组的灰度值之间比较差异有显著性意义($P < 0.05$)

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 实验选用大鼠48只, 分为4组, 每组12只大鼠, 都进入实验数据分析。

2.2 实验前后大鼠体质量的变化 由表1可见, 实验开始时及给药后1, 4周, 实验组和对照组大鼠体质量比较差异无显著性意义($P > 0.05$), 提示该药物对体质量无明显影响。

2.3 给药后复发百分率对比 由表2可见, 加力21 d后上颌第1磨牙平均移动了(0.372±0.025) mm, 各组间差异无显著性意义($P > 0.05$)。给药1, 4周后, 实验组较对照组牙齿复发距离小, 对照组与实验组比较, 差异有显著性意义($P < 0.05$); 高剂量组抑制复发的程度最明显($P < 0.05$)。实验组间比较, 高剂量组复发距离最小, 低剂量组复发最大; 给药4周后, 实验组各组间复发百分率差异均有显著性意义($P < 0.05$)。

2.4 各组大鼠牙槽骨免疫组织化学染色结果 实验动物去除加力装置后, 向近中移动的第1磨牙在牙周纤维的牵引下向远中复发移动。选取第1磨牙近中腭根中部牙槽骨及其周围牙周组织观察组织学改变。与正畸牙齿移动相反, 在复发过程中, 近中腭根的远中侧牙周膜是压力区, 近中侧是张力区(图1)。

牙周膜中骨保护素染色的图像分析结果: 对照组与实验组比较, 压力区和张力区灰度积分, 高、中、低剂量组与对照组比较, 差异有显著性意义($P < 0.05$), 实验组不同

剂量相比, 高剂量比中剂量组和低剂量组明显增加, 差异有显著性意义($P < 0.01$)。实验组与对照组牙周膜骨保护素阳性反应灰度积分比较, 配对 t 检验结果显示张力区略高于压力区, 差异无显著性意义($P > 0.05$, 表3)。

牙周膜中破骨细胞分化因子染色的图像分析结果: 实验组与对照组比较, 压力区和张力区破骨细胞分化因子灰度积分^[23], 差异均有显著性意义($P < 0.01$); 实验组不同剂量组比较, 高剂量比中剂量组和低剂量组明显减低, 差异均有显著性意义($P < 0.001$)。实验组与对照组牙周膜破骨细胞分化因子阳性反应灰度积分, 配对 t 检验结果显示压力区略高于张力区, 差异无显著性意义($P > 0.05$, 表3)。

牙周膜中骨保护素/破骨细胞分化因子比率分析结果: 骨保护素/破骨细胞分化因子比率大于1, 说明骨保护素相对过剩, 破骨细胞的分化和激活受到抑制, 促进骨形成; 骨保护素/破骨细胞分化因子比率小于1, 破骨细胞分化因子相对过剩, 促进破骨细胞的分化和激活。由表3可见: 对照组比率小于1, 实验组牙周组织骨保护素/破骨细胞分化因子比率均大于1, 高剂量组比率最大。

表1 对照组和实验组大鼠给药前后体重变化
Table 1 Change of body weight of rats in different groups

| 时间 | 对照组 | 低剂量组 | 中剂量组 | 高剂量组 |
|-------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| 给药前 | 225.86±8.26 | 213.12±14.52 | 210.64±13.89 | 211.76±14.05 |
| 给药后1周 | 224.65±9.36 | 225.46±13.58 | 230.35±10.64 | 228.62±9.84 |
| 给药后4周 | 312.92±10.35 | 320.26±12.84 | 325.62±13.54 | 317.89±11.28 |

表注: 经统计学分析, 各组之间差异无显著性意义, 提示药物对体重无明显影响。

3 讨论 Discussion

近年来, 口腔正畸治疗备受关注, 但是正畸治疗过程中以及结束后出现的一系列问题也常常困扰着医生和患者, 正畸治疗在历经长时间的矫正结束之后迎来的又是漫长的保持时间, 此时患者往往产生厌倦心理而不能积极配合, 比如正畸治疗中出现的釉质脱矿、牙周组织损害、粘结剂过多对牙龈产生的机械刺激、牙移动过程中的牙合创伤以及矫正后复发等问题, 主要原因为牙周组织重建较慢。本实验主要探究丹参酮IIA作用于骨保护素和破骨细胞分化因子对骨建的调节作用, 以验证其加速骨组织重建方面的促进作用, 但是其深层次的作用机制尚不明确, 有待进一步探讨研究, 以期为临床试验带来可行性益处。

研究发现有许多药物、激素、细胞因子能减慢牙齿移动的速度。体内正常的雌激素能维持机体骨改建的平衡。通过对人破骨细胞、成骨细胞和成纤维细胞的研究, 证实存在这些细胞中存在雌二醇的特异性受体。当体内缺乏雌激素时, 前列腺素、白细胞介素1、肿瘤坏死因子等水平发生改变, 导致骨代谢加快, 骨吸收和新骨形成均增加, 骨质

表2 对照组和实验组大鼠给药1, 4周后的复发距离和复发百分率
Table 2 Recurrent distance and recurrent percentage in different groups at 1 and 4 weeks after treatment

| 时间 | 对照组 | 低剂量组 | 中剂量组 | 高剂量组 |
|------------|-------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 1周复发距离(mm) | 0.258±0.365 | 0.196±0.026 ^a | 0.156±0.304 ^a | 0.117±0.029 ^a |
| 1周复发百分率(%) | 75.33 | 52.36 ^a | 37.65 ^a | 32.16 ^a |
| 4周复发距离(mm) | 0.348±0.064 | 0.253±0.028 ^a | 0.215±0.036 ^a | 0.195±0.026 ^a |
| 4周复发百分率(%) | 94.60 | 74.58 ^a | 62.83 ^a | 52.42 ^a |

表注: 给药1, 4周后, 大鼠牙齿移动复发距离小于对照组、复发百分率明显低于对照组, 与对照组比较, ^a $P < 0.05$

表3 实验组与对照组近牙槽骨表面牙周膜骨保护素、破骨细胞分化因子阳性反应灰度积分及骨保护素/破骨细胞分化因子比率

Table 3 Osteoprotegerin and osteoclast differentiation factor expression in periodontal tissue, as well as the ratio of osteoprotegerin and osteoclast differentiation factor in different groups

| 项目 | 对照组 | 低剂量组 | 中剂量组 | 高剂量组 |
|-------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 骨保护素染色 ($\bar{x} \pm s$) | | | | |
| 压力区 | 129.56±2.36 | 148.96±3.01 | 144.35±3.26 | 139.86±3.96 |
| 张力区 | 138.62±3.84 | 151.35±1.52 | 156.12±1.32 | 157.03±1.26 |
| 破骨细胞分化因子染色($\bar{x} \pm s$) | | | | |
| 压力区 | 145.32±1.23 | 122.63±1.31 | 126.65±0.89 | 130.54±0.92 |
| 张力区 | 142.06±0.96 | 123.84±0.76 | 124.89±0.66 | 129.63±0.54 |
| 骨保护素/破骨细胞分化因子 | | | | |
| 压力区 | 0.864 | 1.035 | 1.164 | 1.368 |
| 张力区 | 0.921 | 1.062 | 1.196 | 1.285 |

表注: 骨保护素阳性反应灰度积分比较: 实验组显著高于对照组, 破骨细胞分化因子阳性反应灰度积分比较: 实验组显著低于对照组, 对照组和实验组牙周组织骨保护素/破骨细胞分化因子比率均大于1, 高剂量组比率最大。

出现疏松, 牙齿移动加快。雌激素的缺乏还能对牙周膜产生影响, 使得受力后压力侧透明性变增加, 而张力侧新骨形成增加。

骨吸收与骨形成之间的动态平衡是受各种影响因素相互作用调控的, 包括成长因子、激素、和应力刺激^[24]。最近研究分析一致认为有规律的体育运动能够增加2%-3%的骨量, 甚至在骨骼原来基础上逐级增加, 预防骨折发生^[25]。然而, 循环的过度使用骨骼可能会由于压应力作用于骨引起应力性骨损伤^[26]。长期受到训练的运动员和军人中经常出现这种损伤。避免骨骼损伤是任何脊柱动物生存的关键。而不仅仅是骨组织的内在能力感知, 还是使其形态来适应新的功能要求。

为了解决骨骼的脆弱性, 许多医学研究者的研究主要集中在利用激素或者化合物通过干预骨重建循环中某一特殊部分来促进成骨细胞活跃, 或者抑制骨吸收^[27]。但是这些方法不能从根本上改善骨组织适应外界应力的能力。只有对骨对功能性要求发生适应性改变的能力的分子通路调控机制有深入的了解, 才能找到合理更加有效的解决方案。众所周知, 机械应力是调节骨骼结构和功能的基础

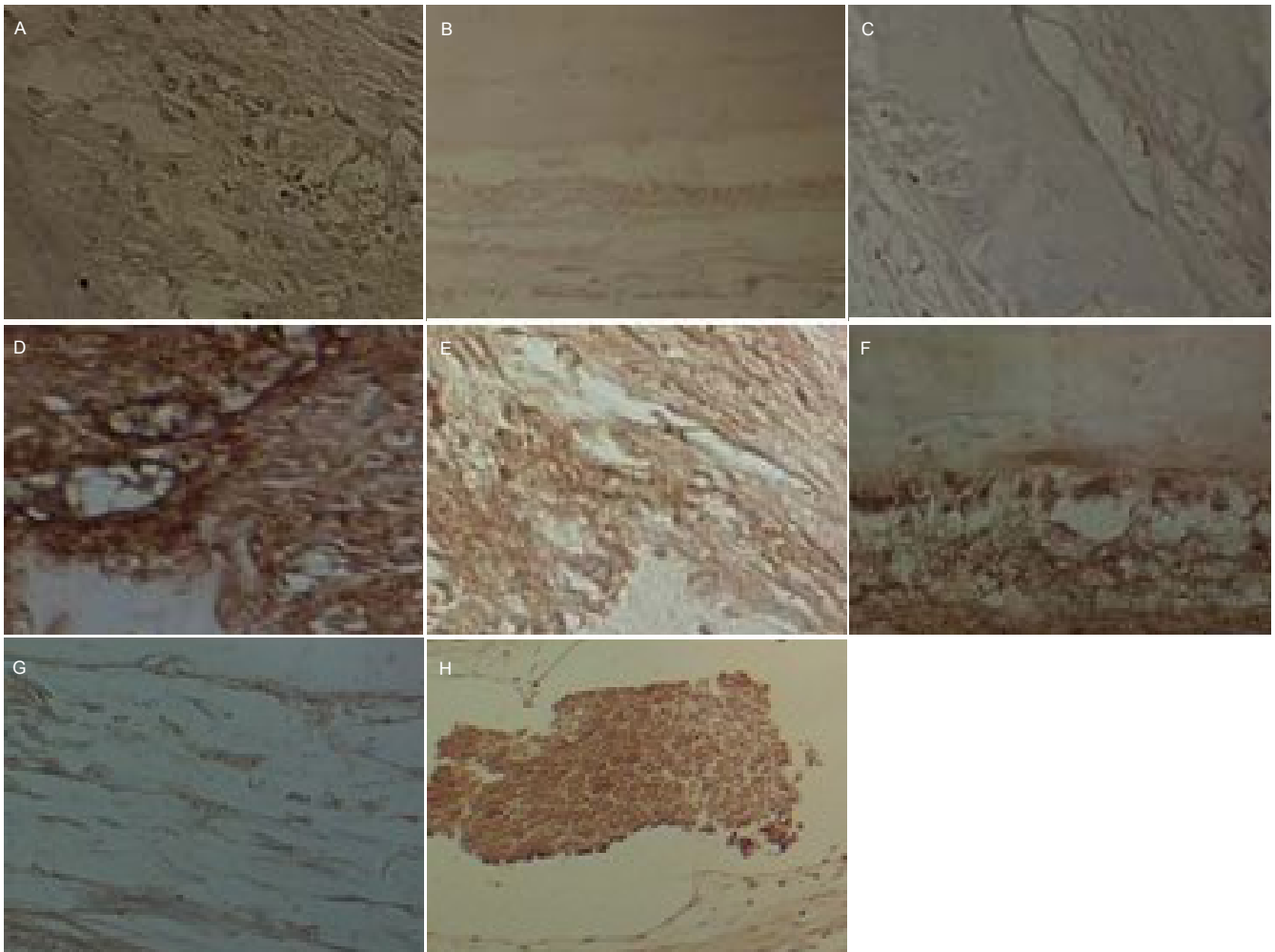


图1 高中低剂量及对照组大鼠牙周膜中骨保护素和破骨细胞分化因子的表达(免疫组织化学染色, $\times 400$)

Figure 1 Osteoprotegerin and osteoclast differentiation factor expression in the periodontal tissue (immunohistochemical staining, $\times 400$)

图注: 图中 A, B, C 分别为骨保护素在高、中、低剂量组的表达; D, E, F 分别为破骨细胞分化因子在高、中、低剂量组的表达; G, H 分别为骨保护素在对照组的表达和破骨细胞分化因子在对照组的表达。高、中、低剂量组骨保护素阳性反应灰度积分显著高于对照组, 高、中、低剂量组破骨细胞分化因子阳性反应灰度积分显著低于对照组。

生理学因子。骨骼成长、发育及骨折愈合的过程中机械应力在骨骼重建中起着至关重要的作用。成骨细胞和破骨细胞是负责骨形成和骨吸收的两个特殊的细胞, 因此许多研究者已经研究了两个细胞在骨重建过程中的相互作用。

20世纪90年代发现骨保护素/核因子 κ B受体活化因子/破骨细胞分化因子对骨吸收的调节作用在理解骨骼如何构造和重建中有了重大的突破, 破骨细胞分化因子/核因子 κ B受体活化因子信号通路在正常骨形成和重建中调节破骨细胞的分化、形成, 在病理的条件下增强骨代谢。骨保护素通过与破骨细胞分化因子结合来抑制破骨细胞分化因子与核因子 κ B受体活化因子结合, 这样可以抑制骨组织过度吸收。已有研究证明了骨保护素和破骨细胞分化因子在骨骼重建过程起这重要的作用^[28-29], 骨保护素的合成与破骨细胞分化因子和核因子 κ B受体活化因子的表达与骨细胞的活化、分化有联系, 在骨重建中起着重要的作用。破骨细胞发挥功能时的主要作用就是骨吸收。能诱导骨吸收发生、

进行的唯一细胞就是破骨细胞。有研究认为, 肿瘤细胞和巨噬细胞对骨吸收也能诱导。进一步的研究发现, 肿瘤细胞对骨吸收的诱导不是直接的, 而是产生细胞因子从而诱导、激活破骨细胞; 在成骨细胞和骨基质内细胞因子的共同作用下能够诱导单核巨噬细胞分化形成成熟的破骨细胞, 从而发挥吞噬骨碎片的功能^[30]。所以目前的研究结果一致认为引起骨吸收的唯一细胞是破骨细胞^[31]。破骨细胞由造血系统的单核细胞分化而来, 和巨噬细胞的来源相同, 单核细胞在特定条件下融合形成多核巨细胞并分化形成破骨细胞^[32-33]。

当小鼠基因敲出骨保护素后会患严重的骨质疏松症^[34]。而小鼠基因过度表达骨保护素时, 将出现严重的石骨症^[35]。Shiotani等^[36]的研究证实了破骨细胞分化因子-骨保护素系统主要是对破骨细胞的分化和重吸收的作用。其他细胞因子均是通过破骨细胞分化因子/核因子 κ B受体活化因子/骨保护素环路来调控破骨细胞的活化和功能^[37]。

研究认为, 骨保护素/破骨细胞分化因子比值的减小造

成骨吸收与骨形成的不平衡, 导致骨量的丢失, 骨原细胞的稳态亦在不同水平受到影响^[38-39]。Bateman等^[30]通过动物实验研究表明, 骨保护素可阻止与制动相关的骨丢失。贾少杰等^[40]用免疫组织化学法对雌激素的骨保护素/破骨细胞分化因子机制进行研究, 结果显示, 在雌激素缺乏时, 破骨细胞数量增加且生存时间延长, 破骨细胞表面的核因子 κ B受体活化因子是破骨细胞分化因子的惟一受体, 骨保护素由成骨细胞分泌, 竞争性地与破骨细胞分化因子结合, 抑制了破骨细胞分化因子与核因子 κ B受体活化因子结合后的生物活性, 从而抑制破骨细胞的成熟^[41]。梁少俊等^[42]对绝经后骨质疏松与血清骨保护素及破骨细胞分化因子关系的研究中也证实血清骨保护素增高是对抗绝经后骨吸收加快的一个代偿反应, 血清中低水平的破骨细胞分化因子骨重建不利, 有骨折的风险, 血清骨保护素与破骨细胞分化因子对骨折产生独立的影响, 提示它们可望作为更加精准的单独预测骨质疏松骨折的骨代谢指标, 并发现绝经后骨质疏松和骨质疏松骨折组的血清骨保护素水平显著低于无骨质疏松组, 血清骨保护素与骨密度呈正相关, 表明骨保护素是独立影响骨密度的因素, 是一种减缓骨吸收速度的因素。

通过研究发现, 慢性牙周炎牙龈组织中破骨细胞分化因子的mRNA表达水平增加^[35], 而骨保护素 mRNA表达水平较弱, 与正常牙周组织表现正好相反。进一步的研究发现牙周病变部位的T细胞中破骨细胞分化因子的表达升高, 在阳性T细胞中破骨细胞分化因子的比例为50%–60%。在这一系列的研究中表明, 骨保护素是抑制破骨细胞骨吸收作用的独立的关键的细胞因子。

近年的许多研究证实人牙间充质细胞及上皮表达破骨细胞分化因子和骨保护素, 且牙周病中牙本质细胞通过前炎症细胞因子来调控破骨细胞分化因子和骨保护素^[43]。体外实验中, 提供10 μ g/L的骨保护素, 牙本质磨片中骨陷窝的数量减少28%, 明显少于对照组^[44]。人牙周膜细胞分泌骨保护素, 抑制破骨细胞前体的分化和功能。

Teng等^[45]将牙周病患者外周血淋巴细胞移给鼠, 用放线共生放线杆菌感染其口腔环境, 发现放线共生放线杆菌刺激CD4⁺T细胞产生破骨细胞分化因子, 注入的骨保护素消除了牙槽骨破坏, 减少了牙周膜的破骨细胞数。在局部青少年牙周炎动物模型中, 牙槽窝中破骨细胞积聚, 骨保护素治疗可抑制其分化和骨质破坏。Mogi等^[46]测量不同程度牙周病患者龈沟液中破骨细胞分化因子和骨保护素的表达时发现, 破骨细胞分化因子浓度增高, 骨保护素浓度降低。这为骨保护素治疗牙周病提供了更有力的证据。金作林等^[21]通过注射雌激素于卵巢切除的大鼠中, 结果显示破骨细胞和牙齿移动与卵巢未切除大鼠比均减少。

结论: 实验首次把丹参酮IIA与正畸牙齿复发联系在一起。采用局部给药, 药物直接作用于牙周组织, 使药物更好

的发挥效用。实验证明了丹参酮IIA在高剂量(1.44 mg/d)时能有效抑制正畸复发。通过调节骨保护素和破骨细胞分化因子的比率来调控破骨细胞, 这可能是其加速牙周组织改建的分子机制。

作者贡献: 实验设计为第一和通讯作者, 实施为全部作者, 第一作者成文, 通讯作者评估。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

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

学术术语: 骨保护素-是一种经由成骨细胞分泌的分泌型蛋白类, 该蛋白属于肿瘤坏死因子受体超家族重要成员并因为它对于破骨细胞分化、成熟等活性抑制的显著作用以及骨密度值正向调节作用而被命名为骨保护素。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin: anovelsecreted Protein Involved in the regulation of bone density. *Cell*. 1997;89(2):309-319.
- [2] Francica GoBi, Lorenz C, Hof Bauer, et al. The expression of osteoprotegerin and RANK ligand support of osteoclast formation by stromal-osteoblast lineage cells is developmentally regulated. *Endocrinology*. 2000;141(12):4768-4776.
- [3] Yeung DK, Leung SW, Xu YC, et al. Puerarin, an isoflavonoid derived from *Radix Puerariae*, potentiates endothelium-dependent relaxation via the eNOS/AMPA pathway in porcine coronary artery. *Eur J Pharmacol*. 2006;552(1-3):105-111.
- [4] 黄生高, 康祖铭, 张建兴, 等. 旋转脉动磁场加速兔正畸牙移动的实验研究[J]. 中国现代医学杂志, 2005, 15(20):3085-3088
- [5] 张丁, 傅民魁, 傅嘉. 丹参对离体破骨细胞的影响[J]. 口腔正畸学, 1995, 2(2):63-64
- [6] 沈刚, 陈荣敬, 刘泓虎, 等. 复方灯盏花加速兔牙移动的运动学模型的建立与分析[J]. 口腔正畸学杂志, 1998, 5(1):31-33
- [7] 丁寅, 陈华, 徐如生. 中药丹参加速正畸牙齿移动的研究[J]. 口腔医学, 1995, 15(3):120-121
- [8] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中国药典[S]. 北京: 人民卫生出版社, 1985:291-292
- [9] 中国医学科学院药物研究所编著. 中草药现代研究(II) [M]. 北京: 医科大学中国协和医科大学联合出版, 1996:472.
- [10] 郑虎占, 董泽宏, 蔡靖. 中药现代研究与应用[M]. 2卷. 北京: 学苑出版社, 1997, 10.
- [11] 史炜, 符诗聪, 杜宁, 等. 丹参有效部位对骨折愈合过程中胶原基因表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2000;20(4):269-271.
- [12] 林润台, 王忠, 刘立波, 等. 丹参促进下颌骨骨折愈合的超微结构研究[J]. 中华口腔医学杂志, 1992;27(4):215-216.
- [13] Liu YR, Qu SX, Maitz MF, et al. The effect of the major components of *Salvia Miltiorrhiza* Bunge on bone marrow cells. *J Ethnopharmacol*. 2007 ;111(3):573-583.
- [14] 陈良娇, 兰泽栋, 陈建明. rhIL-1 α 与1,25-(OH)₂D₃联合作用对牙周膜成纤维细胞表达RANKL和OPG的影响[J]. 口腔医学研究, 2012;28(4):316-320.

- [15] Ren Y, Maltha JC, Kuijpers-Jagtman AM. The rat as a model for orthodontic tooth movement a critical review and a proposed solution. *Eur J Orthod.* 2004;26(5):483-490.
- [16] 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):64-65.
- [17] Hagashi H, Konoo T, Yamauchi K, Intermittent 8-hour activation in orthodontic molar movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2004;125(3):302-309.
- [18] Ong CK, Walsh LJ, Harbrow D, et al. Orthodontic tooth movement in the prednisolone-treated rat. *Angle Orthod.* 2000;70(2):118-125.
- [19] Xu X, Zhang S, Zhang L, et al. The Neuro Protection of Puerarina against cerebral ischemia 15 associated with the Prevention of a population of rats. *Planta Med.* 2005;71(7):585-91.
- [20] Garat JA, Martin AE, Gordillo ME, et al. Effect of orthodontic forces on tooth resorption in molars submitted to experimental periodontitis. *Acta Odontol Latinoam.* 2004;17(1-2):3-7.
- [21] 金作林,丁寅,李潇. 雌激素治疗骨质疏松大鼠正畸牙移动的实验[J]. 中华口腔医学杂志,2001,35(1):55-57.
- [22] 陈丽萍. 骨保护素的有关研究[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志,2007,17(6):361.
- [23] 刘宁,冯云霞,陈显久. 不同正畸力对大鼠牙周组织压力侧 RANKL 表达影响的研究 [J]. 中国实用口腔科杂志,2012,5(2):104-108.
- [24] Liedert A, Wagner L, Seefried L, et al. Estrogen receptor and Wnt signaling interact to regulate early gene expression in response to mechanical strain in osteoblastic cells. *Biochem Biophys.* 2010;394(3):755-759.
- [25] Orava S, Hulkko A, Koskinen S, et al. Stress fractures and bone health in track and field athletes. *Sports Sci Med.* 2000;3(3):268-279.
- [26] Orava S, Hulkko A, Koskinen S, et al. Stress fractures in athletes military recruits. An overview. *Orthopade.* 1995;24(5):457-466.
- [27] Lyritis GP, Georgoulas T, Zafeiris CP. Bone anabolic versus bone antitabolic treatment of postmenopausal osteoporosis. *Ann N Y Acad.* 2010;1205:277-283.
- [28] 陈雁南,裴帆,李晓智,等.局部注射骨保护素与二磷酸盐对大鼠正畸牙移动的影响[J].解放军医学杂志,2011,36(11):1200-1202,1206.
- [29] 陈雁南,裴帆,李晓智,等.局部注射不同浓度骨保护素对大鼠正畸牙移动影响的研究[J].激光杂志,2011,5:89-90.
- [30] Bateman TA, Dunstan CR, Ferguson VL, et al. Osteoprotegerin mitigates tail suspension-induced osteopenia. *Bone.* 2000;26(5):443-449.
- [31] Bekker PJ, Holloway DL, Rasmussen AS, et al. A single-dose placebo-controlled study of AMG 162, a fully human monoclonal antibody to RANKL, in postmenopausal women. *J Bone Miner Res.* 2004;19:1059-1066.
- [32] Manolagas SC, Jilka RL. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling, Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N Engl J Med.* 1995;332(5):305-311.
- [33] Quinn JM, Elliott J, Gillespie MT, et al. *Endocrinology.* 1998;139(10):4424-4427.
- [34] 孔祥鹤,牛银波,李宇华,等. OPG/RANK/RANKL 系统与骨质疏松研究最新进展[J]. 生命科学研究,2011,15(7):80-85.
- [35] Asuda H. Bone and bone related biot-heroical examinati(ms. Bone anti collagen related metabolites. Receptor actiator of NF-kappaB ligand(RANKL). *Clin Calcium.* 2006;16(6):964-970.
- [36] Shiotani A, Takami M, Itoh K, et al. Regulation of Osteoclast Differentiation and Function by Receptor Activator of NFkB Ligand and Osteoprotegerin. *Anatomical Record.* 2002; 268:137-146.
- [37] SahTlon P. Loss of chaotic trabecular structure in OPG-deficient juvenile Paget's disease patients indicates a chaogenic role for OPG in nonlinear pattern formation of trabecular bone. *J Bone Miner Res.* 2004;19(5):695-702.
- [38] 任媛妹. 应力刺激下成牙骨质细胞 OPG/RANKL 的表达及其信号转导通路的研究[D]. 成都:四川大学华西口腔医学院,2007.
- [39] Tang L, Lin Z, Li YM. Effects of different magnitudes of mechanical strain on Osteoblasts in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;344(1):122-128.
- [40] 贾少杰,贾晓静. 绝经后女性骨质疏松与 OPG、RANKL 和 ApoE 的相关性研究[J]. 中国妇幼保健,2007,32(3):1001-1441.
- [41] 高延征,高坤,沈彬,等. 去卵巢后大鼠骨组织中核因子kB受体活化因子配体和骨保护素表达的变化[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2009,13(15):2877-2881.
- [42] 梁少俊,刘宏,杨力. 绝经后骨质疏松与血清 OPG 及 RANKL 关系的研究[J]. 广东医学,2006,27(5):669-671.
- [43] 祝金香,张纲,武曦,等. RANKL/OPG 在高原低氧条件下兔牙周炎发病机制中的作用[J]. 第三军医大学学报,2012,(34)4:320-323
- [44] Itonaga I, Fujikawa Y, Sabokbar A, et al. Rheumatoid arthritis synovial macrophage-osteoclast differentiation is osteoprotegerin ligand-dependent. *J Pathol.* 2000;192(1):97-104.
- [45] Teng YT, Nguyen H, Kong YY, et al. Functional human T-cell immunity and osteoprotegerin ligand control alveolar bone destruction in periodontal infection. *J Clin Invest.* 2000;106(6):59-67.
- [46] Mogi M, Ootogoto J, Ota N, et al. Differential expression of RANKL and osteoprotegerin in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. *J Dent Res.* 2004;83(2):166-169.