

[文章编号] 1000-1182(2011)06-0651-04

# 大鼠牙周膜牵张成骨过程中 血管内皮生长因子和骨钙素的表达

张延晓 周洪 王晓荣

(西安交通大学医学院附属口腔医院 正畸科, 西安 710004)

**[摘要]** 目的 建立大鼠牙周膜牵张成骨牙齿移动模型, 探讨牙周膜牵张成骨过程中血管形成与骨形成的关系。方法 将48只大鼠随机分成实验组和正畸对照组, 所有动物拔除上颌右侧第一磨牙, 正畸对照组按传统方法建立模型, 对实验组上颌右侧第二磨牙近中牙槽骨实施减阻措施后安装牵张装置, 分别在牵张开始后第0、3、5、10、20、30天每组随机处死4只动物, 进行免疫组织化学染色, 观察血管内皮生长因子(VEGF)和骨钙素(OC)随时间的表达变化。结果 实验组VEGF阳性信号主要表达于血管内皮细胞、成纤维细胞、成骨细胞、破骨细胞以及骨细胞; VEGF的阳性表达在加力后逐渐增强, 张力侧和压力侧分别在第10天和第5天达到峰值。OC阳性信号主要出现在牙周膜细胞外基质及成骨细胞中; 张力侧与压力侧均在第10天达到峰值。正畸对照组VEGF和OC表达与实验组相似, 但表达强度较低。结论 VEGF和OC参与了牙周膜牵张成骨牙齿快速移动过程中的牙周组织改建, 具有重要意义。牙周膜牵张成骨中血管形成早于骨形成或二者同时发生。

**[关键词]** 牙周膜牵张成骨; 牙齿快速移动; 血管内皮生长因子; 骨钙素; 血管形成

**[中图分类号]** R 783.5 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1000-1182.2011.06.023

**Expression of vascular endothelial growth factor and osteocalcin during distraction osteogenesis of periodontal ligament on rats** Zhang Yanxiao, Zhou Hong, Wang Xiaorong. (Dept. of Orthodontics, The Affiliated Stomatological Hospital, College of Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China)

**[Abstract]** **Objective** To establish animal models for research of orthodontic tooth under rapid movement through distraction osteogenesis of the periodontal ligament, and to approach the rules of bone formation and the relationship between new bone formation and angiogenesis. **Methods** 48 rats of which the right maxillary first molars were removed were randomly divided into experimental and orthodontic control group. The orthodontic model was established according to traditional method, and the stretch device was installed in the experimental group after reducing the second molar's mesial bone resistance. Four animals in each group were randomly selected to be killed at 6 time points(at day 0, 3, 5, 10, 20, and 30). After specimens were obtained, immunohistochemical staining was done. The expression of vascular endothelial growth factor(VEGF) and osteocalcin(OC) were investigated. **Results** In the experimental group, VEGF was mainly expressed in vascular endothelial cells, fibroblasts, osteoblasts, osteoclasts, and bone cells. The positive expression of VEGF gradually increased, the peak appeared at day 10 on the tension side, and the other side was at day 5. OC-positive signals were seen in the extracellular matrix of periodontal ligament and osteoblastic cells, and its peak appeared at day 10 on both tension and pressure side. The expression of VEGF and OC were similar in orthodontic control group, but the level was lower. **Conclusion** VEGF and OC involve in the remodeling of periodontal tissues and play an important role during periodontal ligament distraction osteogenesis. Angiogenesis is earlier than bone formation, or both appear simultaneously.

**[Key words]** periodontal ligament distraction osteogenesis; rapid tooth movement; vascular endothelial growth factor; osteocalcin; angiogenesis

[收稿日期] 2010-07-06; [修回日期] 2011-01-12

[基金项目] 陕西省科技攻关基金资助项目[2007k14-03(2)]

[作者简介] 张延晓(1983—), 男, 山东人, 住院医师, 硕士, 现工作于无锡口腔医院口腔正畸科

[通讯作者] 周洪, Tel: 029-87218243

正畸牙齿的移动是复杂的骨和牙周组织联合改建的过程, 各种生长因子和激素等参与其中, 维持着骨和牙周组织改建的平衡状态<sup>[1]</sup>。本实验通过研究大鼠牙周膜牵张成骨过程中血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和骨钙素(osteocalcin)

calcin, OC)的表达,探讨其在牙周膜牵张成骨牙齿快速移动中发挥的作用。

### 1 材料和方法

#### 1.1 实验动物

6周龄SD大鼠48只,体重(200±20)g,由西安交通大学SPF动物实验中心提供。动物饲养于SPF实验室,喂饲固体粉末消毒饲料,饮消毒清水,室温约20℃,定期消毒。

#### 1.2 实验仪器和试剂

直径0.3 mm、长8.0 mm的Ni-Ti螺旋弹簧(北京有研亿金新材料股份有限公司);正畸用结扎丝;正畸测力计,精确到克(g)(3M公司,美国);慢速牙科电机和直径为0.5 mm的尖头金刚砂车针(Bee-Bur公司,韩国);京津釉质黏合剂(天津市合成材料工业研究所);500-196型游标卡尺,精确到0.01 mm(日本三丰公司)。辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG(北京博奥森生物技术有限公司);SABC免疫组化试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司);恒温孵箱(上海医疗设备厂),石蜡切片机(西安交通大学医学院地方病研究所提供);尼康E600型显微镜和Leica显微镜照相系统(西安交通大学口腔医院提供)。

#### 1.3 实验方法

1.3.1 动物分组 48只SD大鼠饲养1周后,随机分成实验组和正畸对照组,每组24只,所有动物拔除上颌右侧第一磨牙。正畸对照组按传统方法建立模型<sup>[2]</sup>,加力力值为40 g。对实验组上颌右侧第二磨牙近中牙槽骨实施减阻牵张措施<sup>[3]</sup>,以上颌切牙为支抗,在其和支抗牙上安装自制牵张装置,牵引力值为100 g,加力频率为每2天1次,弹簧每拉伸1 mm对应力值为100 g;自牵引之日起第3、5、7天各加力1次,1周后进入巩固期<sup>[3-4]</sup>。

1.3.2 标本制备和免疫组织化学染色 分别在牵张开始后第0、3、5、10、20、30天在两组动物中随机选择4只动物处死<sup>[4]</sup>。4%多聚甲醛进行心脏灌注,固定48 h,10%乙二胺四乙酸脱钙,石蜡包埋,平行于牙齿长轴按照近远中方向切片,片厚5 μm。按照说明书要求进行VEGF和OC的免疫组织化学染色。利用已知阳性组织为阳性对照,用PBS代替一抗为空白对照。每次实验均设阳性和空白对照。

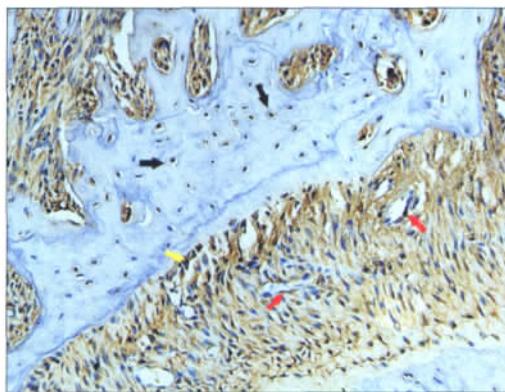
1.3.3 图像获取和统计学分析 采用尼康E600型显微镜观察切片,Leica显微镜照相系统采集图像,Image-pro plus 6.0图像分析软件进行分析。分析移动磨牙牙根张力侧和压力侧牙周组织中的阳性信号强度,在相同标尺下计算积分光密度值(integral optical density, IOD)。对每张切片中移动牙齿的张力侧和

压力侧各测量3次,以交互方式进行测定,取平均值。利用SPSS 16.0软件进行统计分析。

### 2 结果

#### 2.1 VEGF的表达情况

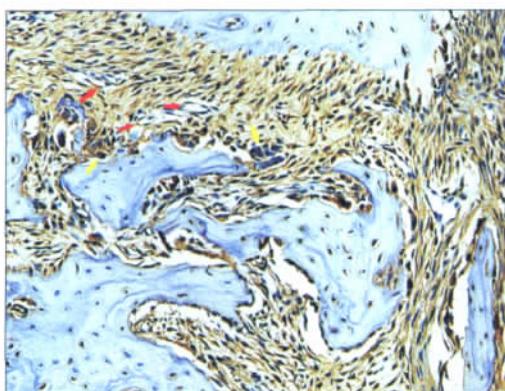
张力侧VEGF阳性信号主要表达于血管内皮细胞、成纤维细胞、成骨细胞以及骨细胞(图1),压力侧主要表达于血管内皮细胞、牙周膜及破骨细胞(图2)。



黑色箭头:骨细胞;黄色箭头:成骨细胞;红色箭头:血管内皮细胞。

图1 实验组10 d时张力侧VEGF的表达 SABC ×200

Fig 1 VEGF positive cells of tension side at 10 d in experimental group SABC ×200



红色箭头:血管内皮细胞;黄色箭头:破骨细胞。

图2 实验组10 d时压力侧VEGF的表达 SABC ×200

Fig 2 VEGF positive cells of pressure side at 10 d in experimental group SABC ×200

2组张力侧VEGF的阳性表达在加力后逐渐增强,第10天达到峰值,第20、30天略有下降(图3)。实验组在各个时间点的阳性表达均强于对照组,其中在第5、10、20天两组比较的差异有统计学意义(P<0.05)。

牵张开始后,2组压力侧VEGF的表达均逐渐增强,第5天达到峰值,随后逐渐下降(图4)。实验组在各个时间点VEGF的表达均强于对照组,其中在第3、5、10、20天的差异有统计学意义(P<0.05)。

#### 2.2 OC的表达情况

OC的阳性信号主要出现在牙周膜细胞外基质及成骨细胞中,在成骨细胞中表达最强。基质中主要表

现为较均匀的棕黄色染色。张力侧主要定位表达于成骨细胞、牙周膜成纤维细胞、骨细胞和骨髓基质细胞等；压力侧主要表达于牙周膜成纤维细胞、破骨细胞、骨细胞和骨髓基质细胞等；另外在牙根表面偶见成牙骨质细胞和成牙本质细胞的阳性表达(图5)。

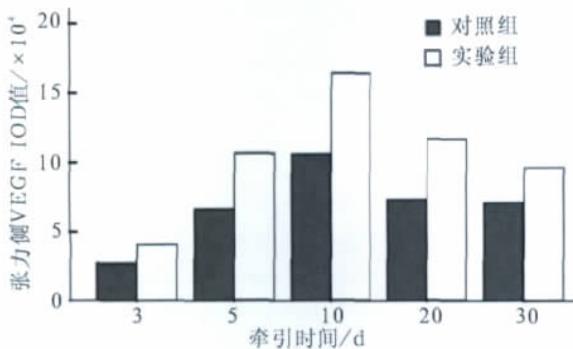


图3 2组张力侧VEGF随时间变化的表达情况

Fig 3 VEGF expression of tension side over time in two groups

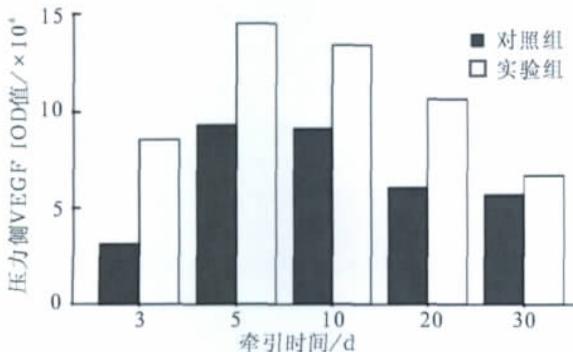
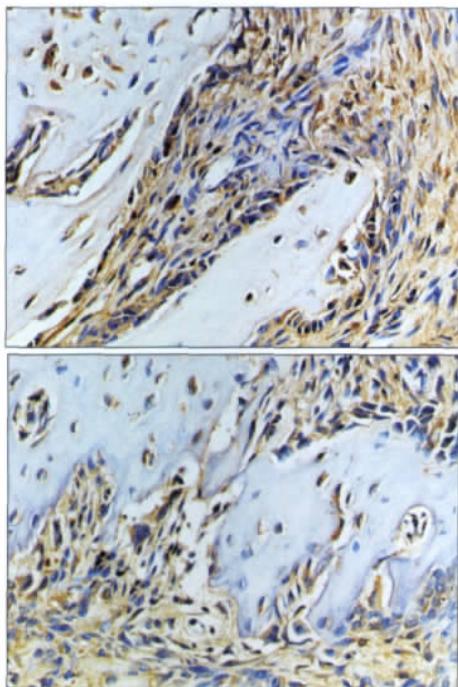


图4 2组压力侧VEGF随时间变化的表达情况

Fig 4 VEGF expression of pressure side over time in two groups



上：张力侧；下：压力侧。

图5 实验组第10天时OC的表达 SABC ×200

Fig 5 Expression of OC at 10 d in experimental group SABC ×200

实验组和对照组张力侧OC的阳性表达均随时间延长而增强，第10天达到峰值，第20、30天略有下降；实验组在各时间段的表达强度均高于对照组，第10天的差异有统计学意义( $P<0.05$ )。两组压力侧OC的表达均在第10天达到峰值，第20天略有下降，第30天又稍微升高；各时间段实验组的阳性表达强度均高于对照组，第10天的差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

### 3 讨论

本实验通过观察VEGF和OC在牙周膜牵张成骨牙齿快速移动过程中的变化，探讨其在牙周膜牵张成骨中发挥的作用。相比以往的大动物模型，大鼠模型建模简单，便于进行大样本量的研究。

VEGF是血管生成的一种重要调节因子<sup>[5]</sup>，能够特异性地促进血管增殖，诱导骨细胞的形成。VEGF调控下的血管发生是骨形成过程的重要部分<sup>[6]</sup>。VEGF在正常成人和动物组织中的表达水平一般较低<sup>[7]</sup>，本实验加力前未见明显的VEGF表达，说明在正常情况下牙周组织的改建活动很少。随着力的施加，实验组和正畸对照组VEGF表达均增强，并贯穿于牙周组织改建的全过程。VEGF在张力侧和压力侧的定性表达说明VEGF在张力侧骨形成和压力侧骨吸收的过程中可能发挥作用。牙齿移动是一个牙槽骨改建的过程，骨的改建离不开血管的形成。Rygh等<sup>[8]</sup>研究认为：在正畸牙齿移动过程中，压力侧和张力侧的牙周膜和邻近的牙槽骨内都存在强烈的血管化作用。刘建林等<sup>[7]</sup>在大鼠正畸牙齿移动模型中发现：加力3 d组的压力侧VEGF表达增强，其张力侧也有VEGF的表达，略低于压力侧；7、14 d为表达高峰期，21 d时VEGF表达有所减弱。本实验中牵张组和正畸对照组VEGF的阳性表达均与之相似，说明VEGF在牙周膜牵张成骨和正畸移动中发挥作用的方式可能是一致的。从表达强度上看，实验组在各个时间段均强于对照组，表明实验组在张力侧的血管扩张更为明显，成骨活动更为活跃。新生的毛细血管内皮细胞可以直接作用于骨组织而促进压力侧的骨吸收，VEGF又主要表达于血管内皮细胞，所以压力侧VEGF的表达对于透明性变组织的吸收具有重要意义，实验组的骨吸收作用更明显。在实验过程的后期，VEGF的表达有所下降，提示VEGF可能主要在牙齿移动初期发挥作用，也可能是牙周组织改建活动下降的结果；实验组大鼠张力侧牙周组织中VEGF的表达较压力侧稍强，可能是因为在牵张成骨加力初期，张力侧牙周膜血管扩张，成骨活性反应增强，而压力侧血管受压缩，血流缓慢，血管分布密度也相应减少。

OC与骨的形成和骨密度的增加有密切的关系，

是成骨细胞活动和骨转换的重要指标。对照组牙齿压力侧和张力侧的牙周膜中OC的阳性表达无明显差异,阳性信号主要出现在牙周膜细胞外基质及成骨细胞中,说明OC与骨形成有密切的关系。研究<sup>[9]</sup>表明,OC表达水平与骨改建呈正相关关系。当成骨细胞功能增强时,OC表达升高,反之则下降。无论是实验组还是对照组,随着力的施加,OC的阳性表达均有所增强。李小彤等<sup>[10]</sup>通过体外研究发现:人牙周膜成纤维细胞在牵张力作用下,OC等成骨样蛋白表达增强且具有时序性。实验组和对照组张力侧OC阳性表达随着时间而增加,表明在牵张力作用下成骨细胞分泌基质蛋白增加,新骨形成亦相应增加。King等<sup>[11]</sup>利用组织形态学测定和血清OC检测相结合的方法研究正畸牙移动过程中骨转换的情况,发现在骨形成的高峰期血清OC浓度升高。本研究结果与之基本一致,说明实验组的牵张力值在牙周组织所承受的范围之内。合适的力学刺激能够提高牙周组织中OC的表达水平,从而促进骨改建。实验组OC的表达在第10天达到峰值,可能是因为牵张早期成骨细胞处于增殖阶段,到第10天以后成骨细胞处于基质矿化期,OC表达才达到峰值。

在牙齿移动过程中骨形成和骨吸收的平衡受到各种细胞因子的调节,OC可以作用于成骨细胞进而促进骨吸收。Kobayashi等<sup>[12]</sup>将OC局部注射于正畸移动的大鼠,发现牙齿移动加快。本实验中实验组和对照组压力侧的OC表达在第10天达到峰值,并且两组的差异有统计学意义,提示在牵张力的刺激下,压力侧牙周组织中成骨细胞合成并分泌OC,而OC对单核吞噬细胞具有一定的趋化作用,促进其向牙槽骨移动,增加了破骨细胞的数量,从而导致骨吸收。King等<sup>[13]</sup>通过组织学观察发现:正畸牙齿移动的后期成骨细胞数量减少,破骨细胞数量上升,同时血清中碱性磷酸酶和OC也呈上升趋势。本实验也发现压力侧OC表达在第20天略有下降后,第30天又稍微升高。无论张力侧和压力侧,实验组OC的表达均强于对照组,说明活跃的成骨活动可以进一步调节压力侧的破骨活动,加快骨的更新转换,提高了牙齿的移动速度。

张力侧OC的表达与VEGF的表达规律具有相似性,充分说明血管形成与骨形成具有密切的联系。二者均在第10天达到峰值,说明牙周膜牵张成骨中血管形成发生于新骨生成之前或者二者同时发生,Sojo等<sup>[13]</sup>在大鼠股骨延长实验中也得出类似结论。另外,本实验只观察了实验组和正畸对照组VEGF和OC短时间的变化,未考虑手术创伤和自身修复对实验结果的影响,后续实验将进一步完善。

## [参考文献]

- [1] Masella RS, Chung PL. Thinking beyond the wire: Emerging biologic relationships in orthodontics and periodontology[J]. *Semin Orthod*, 2008, 14(4): 290-304.
- [2] 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.  
Huang Yan, Wang Xuxia, Zhang Jun, et al. Establishment of animal model for research of orthodontic tooth movement[J]. *Stomatology*, 2007, 27(2): 64-66.
- [3] 王爽, 叶湘玉, 周洪, 等. 犬牙周膜牵张成骨正畸牙移动中牵张侧的组织学变化[J]. *上海口腔医学*, 2004, 13(4): 312-314.  
Wang Shuang, Ye Xiangyu, Zhou Hong, et al. Histological changes on the stress side in orthodontic rapid tooth movement through distraction osteogenesis of the periodontal ligament on dogs[J]. *Shanghai J Stomatol*, 2004, 13(4): 312-314.
- [4] Okafuji N, Liu ZJ, King GJ. Assessment of cell proliferation during mandibular distraction osteogenesis in the maturing rat[J]. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 2006, 130(5): 612-621.
- [5] Otrrock ZK, Makarem JA, Shamseddine AI. Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: Review[J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2007, 38(3): 258-268.
- [6] Keramaris NC, Calori GM, Nikolaou VS, et al. Fracture vascularity and bone healing: A systematic review of the role of VEGF[J]. *Injury*, 2008, 39(Suppl 2): S45-S57.
- [7] 刘建林, 林珠. 大鼠正畸牙齿移动过程中牙周组织VEGF的表达[J]. *临床口腔医学杂志*, 2003, 19(11): 659-661.  
Liu Jianlin, Lin Zhu. Expression of vascular endothelial growth factor in the periodontal tissues of rats during orthodontic tooth movement[J]. *J Clin Stomatol*, 2003, 19(11): 659-661.
- [8] Rygh P, Bowling K, Hovlandsdal L, et al. Activation of the vascular system: A main mediator of periodontal fiber remodeling in orthodontic tooth movement[J]. *Am J Orthod*, 1986, 89(6): 453-468.
- [9] Kepsch M, Wilkinson M, Petocz P, et al. The effect of fluoride administration on rat serum osteocalcin expression during orthodontic movement[J]. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 2007, 131(4): 515-524.
- [10] 李小彤, 张丁, 傅民魁, 等. 机械牵张力对人牙周膜细胞成骨样细胞功能的影响[J]. *中华口腔医学杂志*, 2002, 37(2): 135-138.  
Li Xiaotong, Zhang Ding, Fu Minkui, et al. Effects of mechanical stretching force on osteoblast like function of human periodontal ligament cells *in vitro*[J]. *Chin J Stomatol*, 2002, 37(2): 135-138.
- [11] King GJ, Keeling SD. Orthodontic bone remodeling in relation to appliance decay[J]. *Angle Orthod*, 1995, 65(2): 129-140.
- [12] Kobayashi Y, Takagi H, Sakai H, et al. Effects of local administration of osteocalcin on experimental tooth movement[J]. *Angle Orthod*, 1998, 68(3): 259-266.
- [13] Sojo K, Sawaki Y, Hattori H, et al. Immunohistochemical study of vascular endothelial growth factor(VEGF) and bone morphogenetic protein-2, -4(BMP-2, -4) on lengthened rat femurs[J]. *J Craniomaxillofac Surg*, 2005, 33(4): 238-245.

(本文编辑 吴爱华)