

[文章编号] 1000-1182(2011)03-0294-05

正畸牙根吸收与龈沟液中牙本质涎磷蛋白和牙本质涎蛋白相关性的实验研究

左志刚¹ 胡敏¹ 姜欢¹ 田莉²

(1.吉林大学口腔医院 正畸科; 2.吉林大学 分子酶学工程教育部重点实验室, 长春 130021)

[摘要] 目的 探讨大鼠龈沟液中牙本质涎磷蛋白(DSPP)和牙本质涎蛋白(DSP)的表达与实验性牙移动所致牙根吸收的关系。方法 36只健康Wistar大鼠随机分成3组:对照组、轻力组、重力组。以上颌切牙为支抗,轻力组和重力组分别以0.392、0.98 N力拉右侧上颌第一磨牙向近中移动。加力7 d后,提取龈沟液,制备实验牙及其牙周组织切片,行苏木精-伊红染色、抗酒石酸酸性磷酸酶染色观察牙根吸收情况,并通过Western blot检测龈沟液中DSPP、DSP的表达。结果 组织学观察:对照组未见明显的牙根吸收,轻力组未见明显的牙根吸收及破牙骨质细胞,重力组在根尖1/3远中区及根分叉附近出现明显牙根吸收。Western blot结果显示:对照组中只有DSPP表达,轻力组和重力组中有DSPP和DSP表达。3组大鼠龈沟液中DSPP、DSP蛋白的表达均有统计学差异($P<0.05$),重力组中2种蛋白表达最高,轻力组次之,对照组最低。结论 在正畸所导致的牙根吸收过程中,龈沟液中有DSPP和DSP的表达。

[关键词] 牙根吸收; 龈沟液; 牙本质涎磷蛋白; 牙本质涎蛋白

[中图分类号] R 783.5 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1000-1182.2011.03.019

Relationship between orthodontics root resorption following experimental tooth movement and the level of dentin sialophosphoprotein and dentin sialoprotein in gingival crevicular fluid ZUO Zhi-gang¹, HU Min¹, JIANG Huan¹, TIAN Li². (1. Dept. of Orthodontics, College of Stomatology, Jilin University, Changchun 130021, China; 2. Key Laboratory for Molecular Enzymology and Engineering, The Ministry of Education, Jilin University, Changchun 130021, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the relationship of expression of dentin sialophosphoprotein(DSPP) and dentin sialoprotein(DSP) in gingival crevicular fluid(GCF) with root resorption following experimental tooth movement in rats. **Methods** 36 Wistar rats were divided into 3 groups on average randomly: Control group, light force group and heavy force group. The experimental teeth were drawn-off mesially by the force of 0.392 N in light force group and 0.98 N in heavy force group, with both of the maxillary central incisors as the tooth of anchorage. At the 7th day, the gingival crevicular fluid of rats were collected; the histological slices were made, including the experimental tooth and periodontal tissue; the tissues was stained with hematoxylin-eosin(HE) staining and tartrate resistant acid phosphatase(TRAP) staining to observe the histological changes of the root resorption of rats. Then the expression of DSPP and DSP were assayed by using biochemistry techniques of Western blot. **Results** Histological observation: There was not root resorption in control group. Neither root resorption nor cementoclast was observed in light force group. And in heavy force group visible root resorption came out in pressure zone. Western blot results: There was expression of DSPP and no DSP in control group, and there was the expression of DSPP and DSP in both light force group and heavy force group. The result of statistical analysis showed that there were significant differences in the expression of DSPP and DSP among three groups. The highest one was heavy force group, followed by the light force group and control group with the least amount of proteins. **Conclusion** There is the expression of DSPP and DSP in gingival crevicular fluid following experimental tooth movement with root resorption.

[Key words] root resorption; gingival crevicular fluid; dentin sialophosphoprotein; dentin sialoprotein

[收稿日期] 2010-07-23; [修回日期] 2010-09-10

[基金项目] 吉林省科技厅基金资助项目(20080042-1)

[作者简介] 左志刚(1982—),男,河北人,住院医师,硕士,现在天津医科大学口腔医院正畸科工作

[通讯作者] 胡敏, Tel: 0431-85579339

牙根吸收是正畸牙移动过程中不易避免的一种现象,目前对于牙根吸收的检查、诊断手段有限^[1],临床上主要应用X线片,但其具有滞后性、静态性等不可避免的局限性,而且确立诊断后也没有行之

有效的治疗措施。因此,早期诊断、监测牙根吸收的发生、发展,对于正畸导致的牙根吸收的基础研究和正畸临床工作都有很大的意义。牙本质涎磷蛋白(dentin sialophosphoprotein, DSPP)和牙本质涎蛋白(dentin sialoprotein, DSP)属于牙本质特异性蛋白,在人的一生中牙本质不断地沉积,这些蛋白通常不被释放到周围组织中,而在牙根吸收活动期牙本质重塑的时候,这些蛋白会释放到牙周膜间隙。近年,龈沟液分析技术得到了迅速的发展,由于其具有方便、无创、准确等优点,目前在牙周临床检查中广泛应用。本实验以大鼠为研究对象,建立实验性牙移动致牙根吸收模型,通过Western blot等手段研究大鼠龈沟液中DSPP/DSP的表达,为利用分子生物学方法早期诊断、监测牙根吸收提供新的思路 and 实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康雄性Wistar大鼠36只(吉林大学白求恩医学部实验动物中心提供),体重 $0.25\text{ kg}\pm 0.02\text{ kg}$,普通饲料分笼饲养,自由摄食饮水。适应性喂养1周后进行实验。

1.2 牙移动致牙根吸收模型的建立

将36只Wistar大鼠随机分成3组:对照组、轻力组和重力组,每组12只。在轻力组和重力组动物的右侧上颌切牙和第一磨牙间置NiTi螺簧,以左右上颌切牙为支抗,分别以0.392 N、0.98 N力拉右侧上颌第一磨牙向近中移动。对照组动物予以伪实验。每日检查装置是否脱落或损坏。隔天测定力值,随时调整NiTi螺簧,以保持力值恒定(图1)。



图1 大鼠牙齿移动模型

Fig 1 The model of tooth movement of rat

1.3 龈沟液提取及处理

加力7 d后,提取各组动物龈沟液并进行样本处理。将大鼠麻醉后固定,干燥右侧上颌磨牙及周围牙龈黏膜,钝性牙周探针工作端背部轻压受试牙腭侧牙龈边缘,使游离龈与牙面轻微分开,将预先剪

掉尖端0.5 mm并已高温高压消毒的15号吸潮纸尖(北京达雅鼎医疗器械有限公司)轻轻插入右侧上颌第一磨牙近、远中腭侧龈沟内至有轻微阻力即停止(约1.0 mm深),留置30 s后取出,间隔1 min后重复2次,带血样本弃去,将纸尖密封于已消毒好的微型离心管中。加入1%的磷酸盐缓冲液(pH=7.2)120 μL ,常温下洗脱1 h,15 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min使蛋白溶解于缓冲液中,弃去吸潮纸尖,提取100 μL 上清液。 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存上清液。

1.4 组织标本的制备

所有动物于提取龈沟液后,应用4%多聚甲醛经心脏灌注处死。切取上颌骨组织(实验侧上颌磨牙区及其周围牙槽骨组织),将标本固定于4%多聚甲醛液中48 h后,10%乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)常温脱钙6周,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,浸蜡,常规石蜡包埋。将标本沿磨牙长轴进行近远中向连续切片,每张厚约5 μm 。选取可见到上颌第一磨牙近中牙根根管的组织切片行苏木精-伊红(hematoxylin-eosin staining, HE)、抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate resistant acid phosphatase, TRAP)染色以观察移动牙周围牙槽骨及牙根吸收的情况。

1.5 龈沟液样本的Western blot分析

$4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下,利用Bradford方法确定各龈沟液样本中的蛋白含量,保证上样时总蛋白量相等。然后制备凝胶,进行SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜后进行蛋白印迹(Western blot分析)。利用BandScan 5.0图像分析软件测定各组样本中DSPP、DSP的灰度值,并对其蛋白条带的灰度进行扫描分析。

1.6 统计学分析

应用SPSS 13.0软件对数据进行多组样本均数的LSD检验,分别比较3组样本中DSPP、DSP两种蛋白条带的灰度值。

2 结果

2.1 大体标本观察

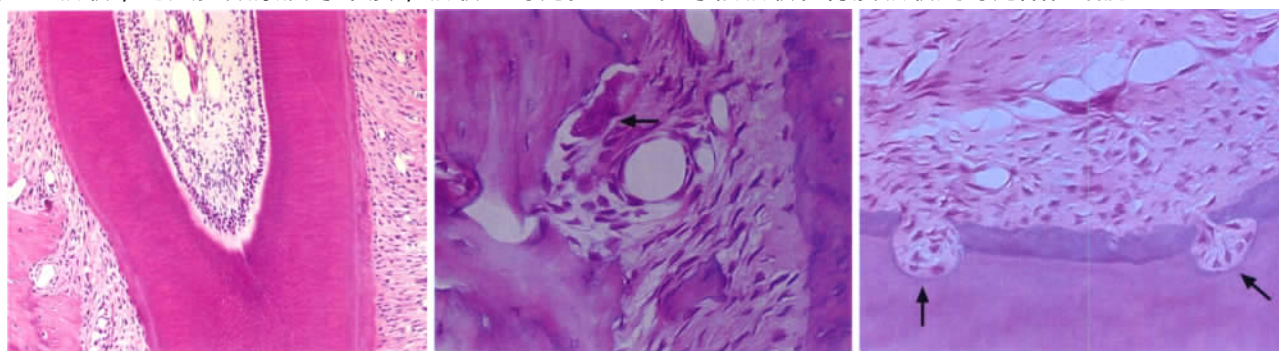
对照组:实验牙无明显变化,第一磨牙和第二磨牙间无间隙。轻力组:实验牙明显近中移动,第一磨牙和第二磨牙间间隙平均约1.5 mm。重力组:实验牙近中移动少许,第一磨牙和第二磨牙间无间隙或有少量间隙(不足0.5 mm)。

2.2 组织学结果

3组标本的组织学观察结果见图2和3。对照组:未见明显的牙根吸收和骨吸收。轻力组:未见明显的牙根吸收及破牙骨质细胞,但骨吸收明显,且多为直接骨吸收,在牙槽骨骨吸收陷窝内可见多核破

骨细胞, TRAP染色阳性。重力组: 根尖1/3远中区及根分叉附近出现明显牙根吸收现象, 牙骨质大面积严重吸收, 绝大多数累及牙本质, 吸收区可见多

核破牙本质细胞, 根吸收区附近的牙槽骨多数可见破骨活动, 牙槽骨内可见潜掘性骨吸收, TRAP染色在牙根吸收和骨质吸收处可见阳性细胞。



左: 对照组未见明显牙根吸收 $\times 100$; 中: 轻力组可见牙槽骨吸收, 箭头示破骨细胞 $\times 400$; 右: 重力组可见牙根吸收累及牙本质, 箭头示破牙本质细胞 $\times 400$ 。

图2 3组标本的组织学观察结果 HE

Fig 2 Results of histological observation of three groups HE



箭头示牙槽骨吸收陷窝内的破骨细胞。

图3 轻力组标本的组织学观察结果 TRAP $\times 400$

Fig 3 Results of histological observation of light force group TRAP $\times 400$

2.3 Western blot分析结果

Western blot分析结果见图4, 从图4可见, 对照组中有1条目的蛋白带, 轻力组和重力组各有2条目的蛋白带。根据分子量判断, 对照组中的目的蛋白带为DSPP, 轻力组和重力组中的2条目的蛋白带为DSPP和DSP。

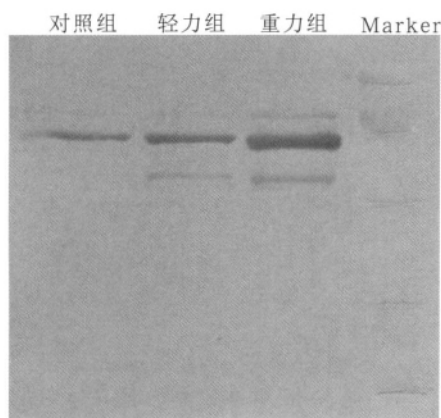


图4 Western blot分析结果

Fig 4 The results of Western blot analysis

3组龈沟液样本中DSPP、DSP的条带灰度值比较见图5。统计分析表明: 3组大鼠龈沟液中DSPP、DSP蛋白的表达均有统计学差异($P<0.05$), 重力组中2种蛋白表达最高, 轻力组次之, 对照组最低。

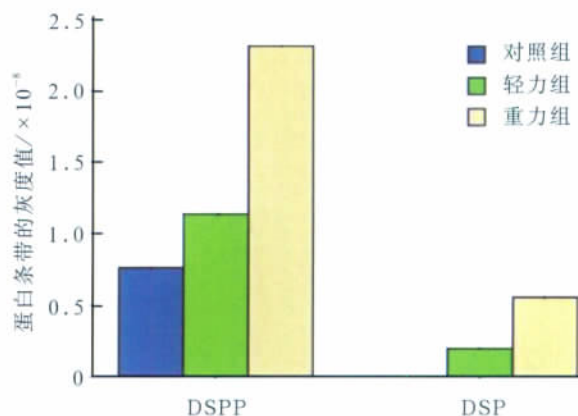


图5 3组龈沟液样本中DSPP、DSP的条带灰度值比较

Fig 5 The gray value of DSPP, DSP among the gingival crevicular fluid of three groups

3 讨论

3.1 牙本质磷蛋白、牙本质涎蛋白在牙本质形成过程中的作用

牙本质涎磷蛋白和/或由其编码的两种蛋白质——牙本质磷蛋白和牙本质涎蛋白参与前期牙本质矿化为牙本质的过程, 在成牙本质细胞分化、牙本质基质形成、矿化及稳定性维持等方面均起到非常重要的作用^[2-5], 并且还具有诱导修复性牙本质生成的功能^[6-7]。

Nakashima等^[8]的研究表明: DSP在牙髓损伤后第三期牙本质的形成过程中表达增强, 提示当成牙本质细胞受到破坏时, 未分化的间充质细胞分泌基质、基质蛋白及生长因子, 促进牙髓的自身修复, DSP

在这一过程中发挥重要作用。张蓉等^[9]对DSPP在牙髓异常状态下的表达情况进行了研究,结果也提示DSPP可能在牙髓损伤后的早期自身修复中起作用。

在正畸治疗导致牙根吸收时,牙齿同样会发生自身防御性反应而形成修复性牙本质,在这种牙根吸收造成牙齿损伤后牙齿的自身修复过程中,DSPP、DSP是否发挥作用以及其表达情况究竟如何呢?本研究以大鼠为研究对象,建立龈沟液提取方法和牙移动致牙根吸收模型,通过Western blot手段比较各组动物龈沟液样本中DSPP、DSP的表达,进一步探讨牙本质磷蛋白、牙本质涎蛋白在牙本质形成过程中的作用。

3.2 动物模型参数的建立

目前研究^[10-14]中采用NiTi拉簧拉第一磨牙向近中倾斜移动的参考力值有0.294、0.392、0.490、0.588、0.833 N不等。King等^[10]采用NiTi拉簧,以上颌双侧切牙为支抗拉第一磨牙向近中倾斜移动,结果发现:0.294~0.588 N力是较适合的正畸力,此时大鼠磨牙发生明显近中移动而未出现牙根吸收。学者^[15-17]研究表明:对大鼠磨牙使用0.784 N或0.980 N正畸力时,牙周组织中破骨细胞的数量减少,牙周组织透明性变区范围大而广,牙齿移动速度慢于轻力组,并可见潜掘性骨吸收和不同程度的牙根吸收,在加力3 d时即出现牙根吸收,加力7 d时牙根吸收达到峰值;而0.392 N或0.490 N力值组的细胞反应较为活跃,整个加力周期内(14 d)牙周组织破坏较小,透明性变区范围小,主要引起直接性骨吸收。由于本实验旨在探寻大鼠龈沟液中DSPP和DSP的表达是否与牙移动所致牙根吸收有关,故本实验轻力组选用0.392 N力,重力组选用0.980 N力,并选择加力7 d时处死动物观察实验结果。

3.3 实验结果分析

本实验结果显示:对照组龈沟液样本中有DSPP表达,无DSP表达,提示在正常状态下,牙本质细胞外基质蛋白可能以DSPP的形式存在,并且释放到龈沟液中。DSPP的功能可能与继发性牙本质一直持续不断地形成有关,其在牙本质形成、矿化过程中起一定作用^[18]。轻力组牙移动龈沟液样本中DSPP、DSP均有表达,且表达量高于对照组。提示在矫治施力过程中,力对牙体组织的刺激会引起牙齿的防御和/或反应性变化,从而引起成牙本质细胞分泌DSPP的量明显增多,DSPP在发挥作用过程中裂解,作为裂解片段之一的DSP亦释放到牙周组织中,在龈沟液中有所表达。重力组牙移动龈沟液样本中同时有DSPP、DSP的表达,且表达量高于其他两组。这一结果与Balducci等^[19]的研究结果相一致。这提

示,在重力牙移动引起牙齿牙骨质大面积吸收甚至侵及牙本质时,牙齿发生自身防御性反应形成修复性牙本质,在这一过程中,部分成牙本质细胞受到刺激发生变性,牙髓深层的未分化间充质细胞分化为成牙本质细胞,分泌牙本质细胞外基质并矿化形成修复性牙本质^[20]。此时细胞外基质蛋白中DSPP的表达量明显增多,并且裂解反应增加,故DSP在龈沟液中的表达显著增加。即在牙根吸收等牙齿损伤的发展过程中,随着损伤程度的增加,龈沟液中DSPP、DSP浓度随之增加,且这些蛋白表达增强的时间点可能发生在临床上或组织学上探测到牙齿损伤之前。

3.4 临床意义与展望

目前临床工作中,牙根吸收的诊断、检测主要依赖X线检查,然而X线只有在矿化组织丧失60%~70%时才能发现牙根吸收,即在治疗5~6个月后牙根吸收才可以有可靠的X线诊断^[1],具有一定的滞后性。所以,寻找一种新的评估方法早期诊断、监测牙根吸收,对于正畸临床工作有很大的意义。

本实验3组样本中DSPP和DSP的表达差异有统计学意义,其中重力组2种蛋白表达最高,轻力组次之,对照组最低,提示龈沟液中DSPP和/或DSP参与了正畸所导致的牙根吸收的过程,同时提示DSPP和/或DSP可能作为一种生物学指标,用于牙根吸收有X线表现或者临床表现之前对牙根吸收进行早期诊断和检测,从而提醒临床医生采取适当措施预防或阻断牙根吸收的发生、发展。当然,今后尚需进一步实验来探讨DSPP、DSP在牙根吸收发生、发展过程中的作用机制,并通过时间轴上的纵向研究寻找2种蛋白在龈沟液中浓度表达的变化规律,进而得到预示牙根吸收发生的准确浓度,从而进一步指导相关临床实验的进行。

[参考文献]

- [1] Levander E, Bajka R, Malmgren O. Early radiographic diagnosis of apical root resorption during orthodontic treatment: A study of maxillary incisors[J]. Eur J Orthod, 1998, 20(1): 57-63.
- [2] Baba O, Qin C, Brunn JC, et al. Colocalization of dentin matrix protein 1 and dentin sialoprotein at late stages of rat molar development[J]. Matrix Biol, 2004, 23(6): 371-379.
- [3] Hao J, Zou B, Narayanan K, et al. Differential expression patterns of the dentin matrix proteins during mineralized tissue formation[J]. Bone, 2004, 34(6): 921-932.
- [4] MacDougall M. Dental structural diseases mapping to human chromosome 4q21[J]. Connect Tissue Res, 2003, 44(Suppl 1): 285-291.
- [5] Kim JW, Hu JC, Lee JJ, et al. Mutational hot spot in the DSPP gene causing dentinogenesis imperfecta type [J]. Hum Genet,

- 2005, 116(3) :186-191.
- [6] Smith AJ, Tobias RS, Cassidy N, et al. Odontoblast stimulation in ferrets by dentine matrix components[J]. Arch Oral Biol, 1994, 39(1) :13-22.
- [7] Tziafas D, Alvanou A, Panagiotakopoulos N, et al. Induction of odontoblast-like cell differentiation in dog dental pulps after *in vivo* implantation of dentine matrix components[J]. Arch Oral Biol, 1995, 40(10) :883-893.
- [8] Nakashima M, Mizunuma K, Murakami T, et al. Induction of dental pulp stem cell differentiation into odontoblasts by electroporation-mediated gene delivery of growth/differentiation factor 11(Gdf11)[J]. Gene Ther, 2002, 9(12) :814-818.
- [9] 张蓉, 肖明振, 赵守亮, 等. 早期牙髓损伤修复中牙本质涎磷蛋白表达的免疫组化研究[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2001, 11(2) : 89-91.
- ZHANG Rong, XIAO Ming-zhen, ZHAO Shou-liang, et al. Immunohistochemical study on expression of dentin sialophosphoprotein during early pulp injury and reparation[J]. Chin J Conserv Dent, 2001, 11(2) :89-91.
- [10] King GJ, Keeling SD, McCoy EA, et al. Measuring dental drift and orthodontic tooth movement in response to various initial forces in adult rats[J]. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 1991, 99(5) :456-465.
- [11] Gu G, Lemery SA, King GJ. Effect of appliance reactivation after decay of initial activation on osteoclasts, tooth movement, and root resorption[J]. Angle Orthod, 1999, 69(6) :515-522.
- [12] Shirazi M, Nilforoushan D, Alghasi H, et al. The role of nitric oxide in orthodontic tooth movement in rats[J]. Angle Orthod, 2002, 72(3) :211-215.
- [13] Rana MW, Pothisiri V, Killiany DM, et al. Detection of apoptosis during orthodontic tooth movement in rats[J]. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 2001, 119(5) :516-521.
- [14] 杨美祥, 丁寅, 徐如生, 等. 正畸牙齿移动中IL-1 β 在骨质疏松大鼠牙周组织中的分布变化[J]. 华西口腔医学杂志, 2000, 18(5) : 314-316.
- YANG Mei-xiang, DING Yin, XU Ru-sheng, et al. Distribution of IL-1 β in periodontium of experimental osteoporosis rats during orthodontic tooth movement[J]. West China J Stomatol, 2000, 18(5) :314-316.
- [15] 卢燕勤, 张素银, 任力锋, 等. 正畸大鼠磨牙牙周膜内破骨细胞的出现与应力的关系[J]. 口腔医学纵横, 2001, 17(2) :116-118.
- LU Yan-qin, ZHANG Su-yin, REN Li-feng, et al. The relationship between stress and osteoclast appearance in periodontal of rat molar in orthodontic tooth movement[J]. J Comprehensive Stomatol, 2001, 17(2) :116-118.
- [16] 徐宇红, 刘媛媛, 刘建国, 等. 不同正畸力作用下大鼠正畸牙周组织的组织学变化[J]. 贵州医药, 2006, 30(5) :405-406.
- XU Yu-hong, LIU Yuan-yuan, LIU Jian-guo, et al. The histological change of periodontal tissue of orthodontics tooth in rats under different orthodontics force[J]. Guizhou Medical J, 2006, 30(5) :405-406.
- [17] 罗玲, 税桦桦, 徐小梅, 等. 大鼠正畸性牙根吸收及牙齿移动差异的研究[J]. 口腔医学, 2008, 28(12) :620-622.
- LUO Ling, SHUI Hua-hua, XU Xiao-mei, et al. Study on orthodontic root absorption and tooth movement discrepancy in rats[J]. Stomatology, 2008, 28(12) :620-622.
- [18] Bègue-Kirn C, Krebsbach PH, Bartlett JD, et al. Dentin sialoprotein, dentin phosphoprotein, enamelysin and ameloblastin : Tooth-specific molecules that are distinctively expressed during murine dental differentiation[J]. Eur J Oral Sci, 1998, 106(5) :963-970.
- [19] Balducci L, Ramachandran A, Hao J, et al. Biological markers for evaluation of root resorption[J]. Arch Oral Biol, 2007, 52(3) : 203-208.
- [20] Ruch JV. Odontoblast commitment and differentiation[J]. Biochem Cell Biol, 1998, 76(6) :923-938.

(本文编辑 李彩)

青岛市卫生人才中心招聘

为广泛引进国内外口腔医学人才,充实和加强青岛市口腔医学人才力量,适应青岛市对口腔医学人才的需求,促进青岛市口腔医学事业的全面可持续发展,特将2011年青岛市口腔医院对口腔医学人才的需求公告如下。

一、高层次人才1人

要求:口腔颌面外科或口腔医学各专业。主任医师资格,10年以上三级甲等医院或专科医院工作经历,专业科室副主任以上任职经历。硕士或博士生导师。副省级以上城市或省会城市专业学会副主委以上任职经历或国家级学会专委会委员任职经历。获得国家或省级科研奖励,有省部级以上在研课题,在国内同行业具有较高的知名度和影响力。

二、博士研究生3人

要求:口腔医学各专业。取得医师资格证书,熟练掌握本专业常见病、多发病的诊断和治疗,具备一定的诊治疑难病例的经验,具有一定的科研能力。

联系人:侯凤春,陈平。联系电话:0532-82821883。E-mail:qdsqyyrsk@163.com。

青岛市口腔医院