

[文章编号] 1000-1182(2008)06-0580-04

· 基础研究 ·

正畸力作用下兔牙周组织中雷帕霉素靶蛋白和核糖体蛋白S6激酶的表达

刘 奕¹, 郭亚峰²

(1.中国医科大学口腔医院 正畸科, 辽宁 沈阳 110002;

2.大庆市人民医院 口腔科, 黑龙江 大庆 163311)

[摘要] 目的 探讨正畸牙移动过程中雷帕霉素靶蛋白(mTOR)和核糖体蛋白S6激酶(p70 S6K)在牙周组织改建中的作用。方法 选用24只日本大耳白兔建立正畸牙移动的动物模型, 将实验动物上颌右侧戴矫治器, 作为实验侧; 左侧未戴矫治器, 作为对照侧。分别在戴矫治器后3、5、7、14 d各处死6只实验动物。采用苏木精-伊红染色、逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)及Western blot免疫印迹分析方法观察牙周组织形态学变化及mTOR和p70 S6K表达的变化。结果 组织形态学观察可见, 实验侧牙周组织较对照侧有明显改建, 牙槽骨由致密变得疏松, 细胞的排列由有序变得紊乱, 牙槽骨的骨壁由平整变得凹凸不平, 出现了破骨细胞及骨陷窝。RT-PCR结果显示, 加力3 d后牙周组织中p70 S6K mRNA表达增强, 7 d后牙周组织中p70 S6K mRNA明显增强, 随后缓慢下降, 与对照侧相比, 其差异有统计学意义($P<0.01$)。Western blot免疫印迹分析与RT-PCR结果一致。结论 在正畸牙移动过程中, 兔牙周组织中mTOR和p70 S6K的表达明显增强, 提示mTOR和p70 S6K参与牙周组织改建, 并在牙周组织改建中起重要作用。

[关键词] 正畸力; 雷帕霉素靶蛋白; 核糖体蛋白S6激酶; 牙周组织改建

[中图分类号] R783.5 **[文献标识码]** A

Expression of mammalian target of rapamycin and p70 S6 kinase in rabbit periodontal tissues remodeling during orthodontic tooth movement LIU Yi¹, GUO Ya-feng². (1. Dept. of Orthodontics, School of Stomatology, China Medical University, Shenyang 110002, China; 2. Dept. of Stomatology, The People's Hospital of Daqing, Daqing 163311, China)

[Abstract] **Objective** To study the role of mammalian target of rapamycin(mTOR) and p70 S6 kinase(p70 S6K) in periodontal tissues remodeling during orthodontic tooth movement. **Methods** Twenty-four rabbits were chosen to establish rabbit models for the study. The right maxillary teeth of each animal treated by orthodontics were the test sides, and the untreated left teeth were the control sides. The animals were sacrificed at 3, 5, 7, 14 d, respectively. The prepared tissue specimens were processed for the study of the change in the histologic morphology with HE staining and the expression of p70 S6K in periodontal tissues by reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) and Western blot techniques. **Results** In the test side, the trabeculae of bone became porous and cells arrayed disorderly, resorption of alveolar bone was observed in histological study. There were many holes in the alveolar bone, osteoblasts were occasionally observed. RT-PCR showed that the expression of p70 S6K mRNA dramatically changed at 3 d. The expression of p70 S6K mRNA in treating periodontal tissues was higher than the control side, especially at 7 d, and then decreased. Compared with the control side, there was significant difference in statistical analysis($P<0.01$). The expression of Western blot was same as the RT-PCR. **Conclusion** Higher expression of mTOR and p70 S6K during orthodontic tooth movement especially plays an important role in the process of periodontium remodeling.

[Key words] orthodontics; mammalian target of rapamycin; p70 S6 kinase; periodontium remodeling

【收稿日期】2008-04-21; 【修回日期】2008-06-10

【基金项目】沈阳市科学技术计划基金资助项目(1072033-1-00)

【作者简介】刘 奕(1964-), 女, 辽宁人, 教授, 博士

【通讯作者】刘 奕, Tel: 024-22891418

正畸力作用于牙齿后可激活牙周组织内的成骨细胞、破骨细胞, 从而导致牙齿支持组织——牙槽骨的吸收和沉积。在此过程中伴随着细胞的生长及胶原蛋白的更新, 蛋白质合成在细胞生长中起重要

作用^[1]。研究表明哺乳动物的雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)为细胞生长的中心调控因子,核糖体蛋白S6激酶(p70 S6 kinase, p70 S6K)为其下游底物之一,对细胞骨架的生长起决定作用,是蛋白质合成的正调控信号^[2]。本研究通过建立实验性兔正畸牙移动模型,观察mTOR和p70 S6K在牙周组织中的表达变化,探讨其在牙周组织改建中的作用。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

RNA提取液Trizol试剂(Sigma公司,美国),逆转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)试剂盒(大连宝生物公司),琼脂糖(上海生工生物工程有限公司),p70 S6K引物、 β -actin由蓝天公司赛百盛设计并合成,mTOR抗体(CST公司,美国),HRP标记羊抗兔IgG、ECL试剂盒(Santa Cruz公司,美国),考马斯亮蓝蛋白定量试剂盒(南京建成生物工程公司)。

1.2 实验分组和动物模型的建立

选取由中国医科大学附属第二医院实验动物中心提供的日本大耳白兔24只,体重为 (2.0 ± 0.2) kg,雌雄不限。所有实验动物均定时、定量摄食,自由饮水。实验动物上颌右侧戴矫治器进行加力,作为实验侧;上颌左侧未戴矫治器,作为对照侧。喂养1周后,2%戊巴比妥钠经耳缘静脉麻醉(2 mL/kg),使用牙科细金刚砂车针在实验动物右侧上颌第一磨牙和左、右侧上颌切牙颈部磨沟,深约0.5 mm,然后将左、右上颌切牙连扎,并在其与第一磨牙间放置镍钛螺簧,以左、右侧上颌切牙为支抗,牵引右侧上颌第一磨牙向近中移动,力值为0.784 N。分别在戴矫治器后3、5、7、14 d经耳缘静脉空气栓塞后处死6只实验动物。

1.3 组织标本的制备

实验动物采用40 g/L多聚甲醛心内灌注的方式行内固定,取出上颌磨牙区骨段,仅保留牙槽嵴顶至牙根部的牙槽嵴,置于RNA提取液Trizol试剂中,放置在-70℃冰箱中保存。提取蛋白标本直接放入EP管中,置于-70℃冰箱中保存。

1.4 方法

1.4.1 总RNA的提取和质量控制 依据RNA提取液和试剂盒说明提取冻结组织中的总RNA,去除骨胶原等杂质,在260 nm和280 nm波长紫外光下测定光密度(A)值,计算 $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ 值,检测其纯度。

1.4.2 引物设计 p70 S6K上游引物为:5'-TTTT-GCGAACAATAGAATACA-3';下游引物为:5'-

TGAAGAATGGGTGAGCTTGA-3',扩增片段长度为301 bp。 β -actin为参照,其上游引物为:5'-TTC-CAGCCCTCCTTCCTG-3';下游引物为:5'-GCCC-GACTCGTCATACTCC-3',扩增片段为315 bp。

1.4.3 RT-PCR产物检测 RT-PCR产物用2%琼脂糖凝胶电泳后,溴化乙锭染色,Biolmage凝胶摄像分析系统进行分析,以p70 S6K与 β -actin的条带密度比值为评定p70 S6K mRNA的相对表达量。应用SPSS 12.0统计软件进行统计学分析。

1.4.4 Western blot免疫印迹分析 将组织块剪碎,悬于500 μ L冰冷缓冲液A(含有20 mmol/L Tris-HCl、0.1 mmol/L正钒酸钠、25 mmol/L氯化钠、2 mmol/L乙二醇四乙酸、2 mmol/L EGTA、1 mmol/L DDT、1 mmol/L苯甲基磺酰氟化物、2 μ g/mL丝氨酸蛋白酶抑制剂、1 μ mol/L钙蛋白酶抑制剂)中,冰浴中将组织匀浆粉碎,4℃下18 000 r/min离心30 min,吸取上清,弃沉淀,考马斯亮蓝法测定样品中蛋白浓度。mTOR、p70 S6K的上清分别用15%、10%十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,然后转移到聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上,经50 V转印2 h后,用TTBS洗PVDF膜3次,每次5 min。用含5%牛血清白蛋白的TTBS封闭,4℃过夜,再与抗mTOR、p70 S6K抗体室温孵育2 h,与相应的HRP标记的羊抗兔二抗(1:5 000)室温孵育1 h,电化学发光法系统显影。分别测量对照侧和加力3、5、7、14 d时mTOR、p70 S6K的表达量,并行灰度值分析。采用SPSS 12.0 For Windows统计分析软件,配对t检验分析Western blot结果。

2 结果

2.1 组织形态学观察结果

对照侧牙周膜结构致密,纤维排列有序,成纤维细胞核的方向与细胞长轴一致,牙槽骨骨壁平整(图1)。

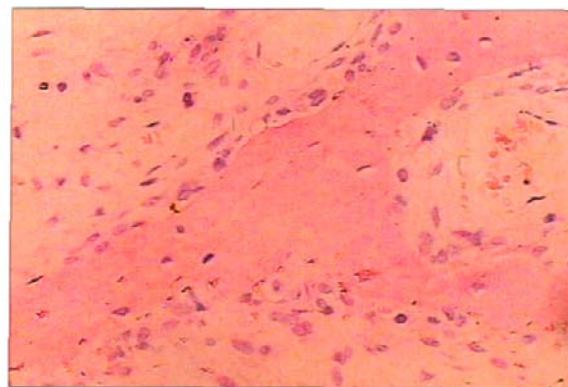


图1 对照侧牙周组织的观察结果 HE $\times 200$

Fig 1 The observation of periodontal tissue in the control sides HE $\times 200$

实验侧在3 d后牙周组织即有改变,在7 d时改变最为明显,光镜下可见骨小梁结构稀疏,细胞排列明显紊乱,牙槽骨骨壁凹凸不平,有很多吸收陷窝,其内有破骨细胞存在(图2)。

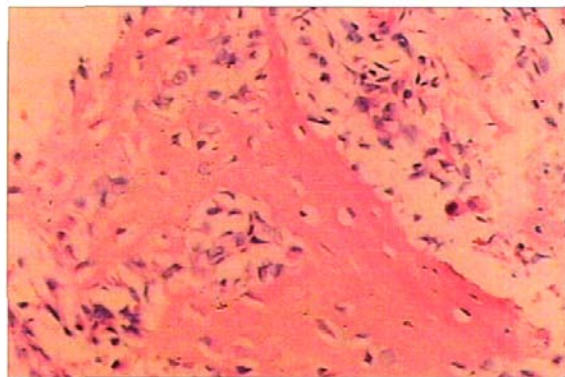
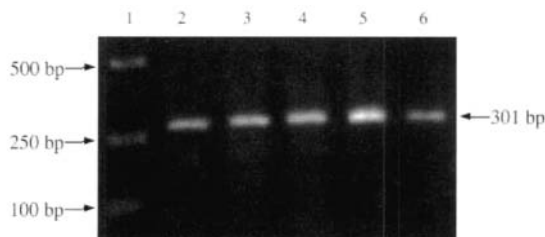


图2 实验侧加力7 d后牙周组织的改建情况 HE ×200

Fig 2 The periodontal remodeling of the experimental sides after located appliances in 7 days HE ×200

2.2 RT-PCR检测结果

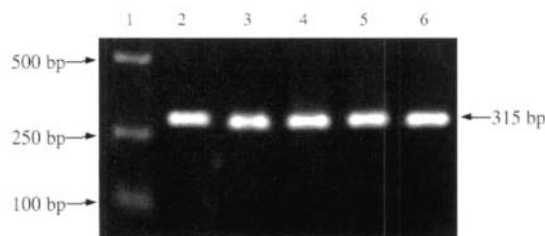
p70 S6K和 β -actin的凝胶电泳图像见图3、4。施力3 d后, p70 S6K mRNA表达增强, 7 d出现高峰, 14 d呈下降趋势。对照侧和加力3、5、7、14 d时, p70 S6K的灰度值分别为68.39、87.78、97.11、127.25、70.03; β -actin的灰度值分别为189.56、191.05、202.41、191.52、204.04。7 d时, 实验侧与对照侧灰度值比为1.86:1, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。



1: Marker; 2: 对照侧; 3: 加力3 d; 4: 加力5 d; 5: 加力7 d; 6: 加力14 d

图3 RT-PCR检测p70 S6K mRNA在牙周组织中的表达

Fig 3 Expression of the p70 S6K mRNA in the periodontal tissue by RT-PCR



1: Marker; 2: 对照侧; 3: 加力3 d; 4: 加力5 d; 5: 加力7 d; 6: 加力14 d

图4 RT-PCR检测 β -actin的表达

Fig 4 Expression of β -actin by RT-PCR

2.3 Western blot免疫印迹分析结果

p70 S6K和mTOR的免疫印迹分析结果见图5、

6。实验侧p70 S6K和mTOR的表达量明显高于对照侧, 尤其在7 d时, p70 S6K的表达量为对照侧的2.3倍, mTOR的表达量为对照侧的2.65倍。

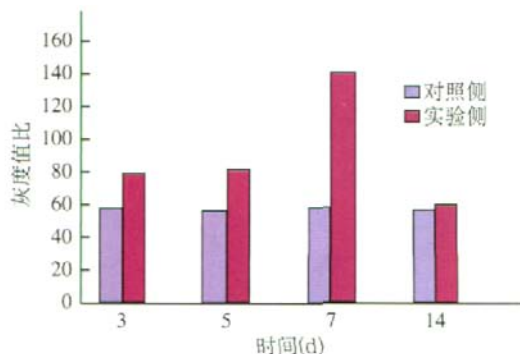


图5 p70 S6K Western blot免疫印迹结果的灰度值分析

Fig 5 Prey scale analysis of Western blot determined the expression of p70 S6K

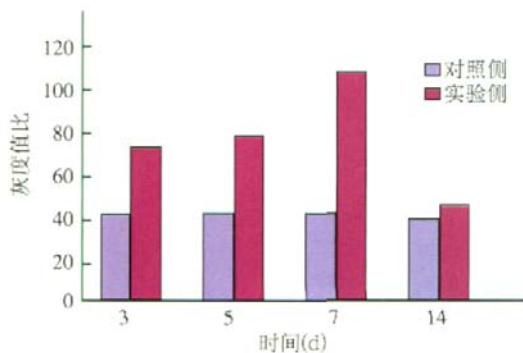


图6 mTOR Western blot免疫印迹结果的灰度值分析

Fig 6 Prey scale analysis of Western blot determined the expression of mTOR

3 讨论

mTOR具有蛋白激酶的活性, 属于一种丝/苏氨酸蛋白激酶。作为PI3K/Akt信号通路下游的一个效应分子, 在调节细胞生长、细胞周期进程、蛋白质合成与降解、参与膜蛋白转运、蛋白激酶C信号转导等生理和病理过程中发挥作用, 可以被看作是细胞生长的中心调控因子^[3-4]。

mTOR在体内可磷酸化多种底物蛋白, p70 S6K为mTOR最直接的下游底物, 是核糖体40S小亚基S6蛋白激酶, 它通过磷酸化S6蛋白激酶, 进而调控5'TOP mRNA翻译蛋白的起始。5'TOP mRNA占细胞总mRNA的20%, 它的主要翻译产物包括许多翻译元件成分如核糖体蛋白、延伸因子1 α 、延伸因子2和多聚腺嘌呤核苷酸结合蛋白等^[5]。

mTOR主要通过两种信号通路调控细胞的生长和增殖: 1)PI3K/Akt/mTOR/S6K通路: PI3K/Akt信号途径现被认为是真核细胞生长和增殖的关键信号途径^[6-8]。可通过Akt直接磷酸化mTOR的Ser 2 448位点, 激活mTOR和它的下游途径, 控制细胞增殖和转化

所需特殊蛋白质的翻译。2)PI3K/Akt/TSC1-TSC2/mTOR/S6K通路:TSC是肿瘤抑制因子,TSC基因发生突变或缺失时会引起细胞黏附、生长和迁移,导致大脑及肾脏结节性硬化损坏。哺乳动物细胞中TSC1-TSC2复合物是mTOR的上游抑制因子,因此在TSC1-TSC2异常的细胞中,mTOR和它下游的效应分子被激活,使得细胞可以不断生长^[9]。这两条信号途径被外界刺激激活后,作用于下游靶目标,即p70 S6K和翻译起始因子4E-结合蛋白,调控多个基因转录和蛋白质翻译,影响细胞周期进程,并最终调节细胞生长、细胞分化、细胞增殖与凋亡。

目前认为,促有丝分裂生长因子、营养成分、细胞能量水平和应力状态等激活mTOR信号通路是通过PI3K/Akt途径来实现的。应用PI3K抑制剂沃曼青霉素和mTOR抑制剂雷帕霉素建立了一种信号转导模型,根据这一模型,生长因子通过与其受体结合激活细胞内PI3K,进而激活Akt,活化的Akt直接磷酸化mTOR,控制细胞增殖和转化所需特殊蛋白质的翻译。

mTOR能够加快细胞周期G₁-S期的转换,促进细胞增殖^[10-11]。Thomas^[12]在对果蝇的研究中发现,敲除S6K的细胞,其周期可明显延长,为正常的2倍。表明S6K对细胞骨架的生长起决定性作用^[13]。在前期研究中,检测到mTOR及p70 S6K在口腔黏液表皮样癌、口腔鳞癌及腮腺腺癌中表达较正常组织明显增强。证明mTOR/p70 S6K信号通路在黏液表皮样癌、口腔鳞癌及腮腺腺癌的发生中起重要调控作用,同时也进一步表明其与细胞生长和增殖间的联系^[14-17]。

正畸治疗的一个基本现象就是牙齿受力后牙周组织发生改建,压力侧牙槽骨吸收,牵张侧牙槽骨沉积,从而使牙齿移动。正畸力作为一种外源性机械力,影响牙齿的移动和牙槽骨的改建。许多实验都提示在机械力作用下牙周组织会产生多种细胞激肽和细胞因子,如转化生长因子β1、骨形态发生蛋白、胰岛素样转化生长因子、血小板衍化生长因子、成纤维细胞生长因子等,这些细胞因子大都能影响成骨细胞的活化和增殖。国外已有报道,在大鼠扩大切牙中缝早期注射外源性转化生长因子β1能促进新骨的形成^[18]。Pavlin等^[19]建立老鼠牙齿移动模型来研究正畸力对成骨细胞增殖的影响,加力2 d后,受力牙齿周围成骨细胞数量开始轻微增加,6 d后细胞开始显著增殖。这一阶段牙周组织积极改建,成骨细胞功能活跃,新骨沉积明显,牙周组织改建逐渐完成。在本实验中也检测到mTOR、p70 S6K的蛋白表达在正畸施力3 d后增强,7 d达高峰,而14 d后有下降趋势,可以推测:正畸力激活成骨

细胞,成骨细胞自身产生激肽和生长因子,正反馈激活自身活化,通过生长因子调控mTOR/p70 S6K信号通路,最终影响成纤维细胞、成骨细胞及破骨细胞蛋白的合成、转录过程,产生一系列的生物效应,最终引发正畸牙齿移动。

正畸牙移动依赖于牙槽骨的改建,这一改建过程存在一个多因素的调控体系。本研究的一个重要发现是:RT-PCR和Western blot免疫印迹分析结果表明,p70 S6K和mTOR在矫治力作用下的牙周组织改建过程中表达明显增强。证明了p70 S6K和mTOR参与正畸牙齿移动的牙周组织改建过程。牙周组织改建过程中需要合成更多的蛋白,p70 S6K和mTOR的表达增强就是为大量合成蛋白质打基础。总之,对mTOR/p70 S6K信号通路与正畸力作用下牙周组织改建关系的研究,将会提高对mTOR/p70 S6K信号通路与正畸牙移动分子机制的认识,并为临床加速正畸牙移动提供有效的理论依据。

[参考文献]

- [1] Conlon I, Raff M. Size control in animal development[J]. Cell, 1999, 96(2): 235-244.
- [2] Horton LE, Bushell M, Barth-Baus D, et al. p53 activation results in rapid dephosphorylation of the eIF4E-binding protein 4E-BP1, inhibition of ribosomal protein S6 kinase and inhibition of translation initiation[J]. Oncogene, 2002, 21(34): 5325-5334.
- [3] Gingras AC, Raught B, Sonenberg N. Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR[J]. Genes Dev, 2001, 15(7): 807-826.
- [4] Schmelzle T, Hall MN. TOR, a central controller of cell growth[J]. Cell, 2000, 103(2): 253-262.
- [5] Jefferies HB, Fumagalli S, Dennis PB, et al. Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k[J]. EMBO J, 1997, 16(12): 3693-3704.
- [6] Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR[J]. Genes Dev, 2004, 18(16): 1926-1945.
- [7] Richardson CJ, Schalm SS, Blenis J. PI3-kinase and TOR: PIK-TORing cell growth[J]. Semin Cell Dev Biol, 2004, 15(2): 147-159.
- [8] Asnaghi L, Bruno P, Priulla M, et al. mTOR: A protein kinase switching between life and death[J]. Pharmacol Res, 2004, 50(6): 545-549.
- [9] Potter CJ, Pedraza LG, Xu T. Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2[J]. Nat Cell Biol, 2002, 4(9): 658-665.
- [10] Jacinto E, Hall MN. Tor signalling in bugs, brain and brawn[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003, 4(2): 117-126.
- [11] 刘奕, Sujata HIDAYAT, 米泽一仁, 等. mTOR及其底物在HeLa细胞的细胞周期不同时相中的表达[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2004, 20(3): 358-362.
- LIU Yi, Sujata HIDAYAT, Kazuryoshi YONEZAWA, et al. Expression of mTOR and its substrates in HeLa cells in different

荷下。但有学者提出：应力过低与应力过高同样值得注意，应力不能低于生理极限，这种过低的应力是否会造成骨的费用性萎缩还有待于进一步研究^[8]。模型B各项应力均明显高于其他3种模型，应力主要集中于皮质骨和松质骨交界、螺纹起始处，此种螺纹设计不可取。模型A垂直载荷下种植体颈部Von-Mises应力、压应力高于模型C和D组，斜向载荷下种植体、皮质骨的Von-Mises应力、压应力稍高于模型D。理想的应力分布状况：应力在界面上均匀分布，界面应力值是一条平滑的曲线，各部位应力差值小。综合比较分析，两种载荷下模型A、D应力分布比较均匀。应力集中主要出现在种植体颈部、皮质骨上缘与种植体接触处和种植体底部最下一个螺纹。以往常见的颈部骨边缘性丧失可能与这一区域的高应力集中有关。综合以上分析笔者建议：种植体螺纹设计为全螺纹分布较佳，从中1/3开始对螺纹行截齿处理，向种植体末端移行，牙高逐渐降低，从而减少种植体底部的应力集中。

本研究的定性分析结果表明，螺纹位置影响种植体-骨界面的应力分布，模型A和D应力分布较均匀，表现出可接受的生物力学行为。为了达到对于种植义齿理想的生物力学环境，种植体设计和选择时谨慎考虑螺纹位置与分布十分必要。

[参考文献]

- [1] Perényi J, Bene L, Radnai M, et al. Model investigation of push-

out test used for quantitative evaluation of dental implant osseointegration[J]. *Fogorv Sz*, 2002, 95(3):105-111.

- [2] van Zyl PP, Grundling NL, Jooste CH, et al. Three-dimensional finite element model of a human mandible incorporating six osseointegrated implants for stress analysis of mandibular cantilever prostheses[J]. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 1995, 10(1):51-57.
- [3] van Rossen IP, Braak LH, de Putter C, et al. Stress-absorbing elements in dental implants[J]. *J Prosthet Dent*, 1990, 64(2):198-205.
- [4] Chun HJ, Cheong SY, Han JH, et al. Evaluation of design parameters of osseointegrated dental implants using finite element analysis[J]. *J Oral Rehabil*, 2002, 29(6):565-574.
- [5] Çağlar A, Aydın C, Ozen J, et al. Effects of mesiodistal inclination of implants on stress distribution in implant-supported fixed prostheses[J]. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2006, 21(1):36-44.
- [6] Teixeira ER, Sato Y, Akagawa Y, et al. A comparative evaluation of mandibular finite element models with different lengths and elements for implant biomechanics[J]. *J Oral Rehabil*, 1998, 25(4):299-303.
- [7] Tepper G, Haas R, Zechner W, et al. Three-dimensional finite element analysis of implant stability in the atrophic posterior maxilla: A mathematical study of the sinus floor augmentation[J]. *Clin Oral Implants Res*, 2002, 13(6):657-665.
- [8] Rieger MR, Adams WK, Kinzel GL. A finite element survey of eleven endosseous implants[J]. *J Prosthet Dent*, 1990, 63(4):457-465.

(本文编辑 王 晴)

(上接第583页)

- cell cycle phases[J]. *Chin J Biochemistry Molecular Biology*, 2004, 20(3):358-362.
- [12] Thomas G. The S6 kinase signalling pathway in the control of development and growth[J]. *Biol Res*, 2002, 35(3):305-313.
- [13] Shima H, Pende M, Chen Y, et al. Disruption of the p70(s6K)/p85(s6K) gene reveals a small mouse phenotype and a new functional S6 kinase[J]. *EMBO J*, 1998, 17(22):6649-6659.
- [14] 刘 奕, 张 扬, 杨鸣良, 等. mTOR/eIF-4EBP1信号通路在黏液表皮样癌发生中的作用[J]. *临床口腔医学杂志*, 2004, 20(6):325-327.
- LIU Yi, ZHANG Yang, YANG Ming-liang, et al. Effect of mTOR/eIF-4EBP1 signal pathway on mucoepidermoid carcinoma[J]. *J Clin Stomatol*, 2004, 20(6):325-327.
- [15] 刘 奕, 杨鸣良, 张 扬, 等. 哺乳动物的雷帕霉素靶蛋白及其底物在口腔鳞状细胞癌中的表达[J]. *华西口腔医学杂志*, 2004, 22(4):331-333.
- LIU Yi, YANG Ming-liang, ZHANG Yang, et al. The expression of mTOR and its substrates in oral squamous cell carcinoma[J]. *West China J Stomatol*, 2004, 22(4):331-333.

- [16] 刘 奕, 包 扬, 赵震锦, 等. mTOR/P70 S6激酶信号通路在腮腺腺癌发生中的作用[J]. *中国医科大学学报*, 2004, 33(3):229-231.
- LIU Yi, BAO Yang, ZHAO Zhen-jin, et al. Effect of mTOR/P70 S6 kinase signal pathway on parotid adenocarcinoma[J]. *J Chin Med Univ*, 2004, 33(3):229-231.
- [17] Liu Y, Hidayat S, Su WH, et al. Expression and activity of mTOR and its substrates in different cell cycle phases and in oral squamous cell carcinomas of different malignant grade[J]. *Cell Biochem Funct*, 2007, 25(1):45-53.
- [18] Sawada M, Shimizu N. Stimulation of bone formation in the expanding mid-palatal suture by transforming growth factor-beta 1 in the rat[J]. *Eur J Orthod*, 1996, 18(2):169-179.
- [19] Pavlin D, Goldman ES, Gluhak-Heinrich J, et al. Orthodontically stressed periodontium of transgenic mouse as a model for studying mechanical response in bone: The effect on the number of osteoblasts[J]. *Clin Orthod Res*, 2000, 3(3):55-66.

(本文编辑 王 晴)