

[文章编号] 1000-1182(2008)04-0439-04

动情周期不同阶段正畸牙移动影响牙周组织胰岛素样生长因子表达的研究

郭杰^{1,2}, 赵青², 陈扬熙²

(1.山东大学口腔医院 口腔正畸科, 山东 济南 250012;

2.口腔疾病研究国家重点实验室, 四川大学, 四川 成都 610041)

[摘要] 目的 探讨正畸力对牙周组织胰岛素样生长因子(IGF)表达的影响,从体内实验角度阐明雌激素和应力对局部骨改建的调控途径和机制。方法 建立在Wistar雌性大鼠动情周期不同阶段给予正畸加力的实验模型,采用核酸原位杂交技术检测雌性大鼠动情周期不同阶段牙周组织中IGF mRNA的表达变化。采用SPSS 11.0软件包,单因素方差分析法(one way ANOVA)比较动情周期同一阶段加力实验组与对照组差异,Student-Newman-Keuls(S-N-K)法进行同一组内动情周期不同阶段各亚组间的两两比较。结果 正畸牙移动使处于动情周期不同阶段的雌性大鼠牙周组织中的IGF mRNA含量增加,其中IGF- mRNA的表达在动情期最低,而动情前期最高($P<0.05$);而IGF- mRNA的表达在动情周期中没有明显规律。结论 IGF- 不仅可以在应力反应中由骨形成细胞在局部合成,而且还与动情周期的全身激素状态有关,而IGF- 则是对应力发生反应的一种局部生长因子。

[关键词] 牙移动; 动情周期; 胰岛素样生长因子

[中图分类号] R783.5 **[文献标识码]** A

Effects of orthodontic tooth movements on insulin-like growth factors expression in periodontal tissues
GUO Jie^{1,2}, ZHAO Qing², CHEN Yang-xi². (1. Dept. of Orthodontics, School of Stomatology, Shandong University, Jinan 250012, China; 2. State Key Laboratory of Oral Diseases, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] Objective To elucidate the regulatory bio-mechanism of estrogen and local stress on the bone remodeling activities in vivo. Methods A Wistar rat experimental model was established to apply orthodontic activation during different stages of estrous cycle. In situ hybridization was used to detect the variation of the insulin-like growth factors(IGF) mRNA expression in the periodontal tissues. The data of each group was analyzed with SPSS 11.0 software package for Student-Newman-Keuls(S-N-K) test and one way ANOVA test. Results Both IGF- mRNA and IGF- mRNA level expressed in the periodontal tissues were increased by orthodontic activation during various stages of the estrous cycle. But a similar pattern emerged that the IGF- mRNA level was the lowest in the estrous stage, whereas its level was the highest in the proestrus stage ($P<0.05$). No rhythm of IGF- mRNA expression found during the estrous cycle. Conclusion It was concluded that local mechanical stimulation directly enhanced the IGF expression. In contrast to the IGF- , IGF-I was also influenced by the sex hormone rhythm during the estrous cycle.

[Key words] tooth movement; estrous cycle; insulin-like growth factor

正畸牙移动是一种通过机械外力刺激引起局部牙周改建的生物治疗,成功与否不仅受到牙齿所受正畸力的影响,同时也与全身和局部的生化环境密切相关。在接受正畸治疗的患者中以女性患者为

多,月经周期是成年女性正常的生理周期,体内雌激素随之发生节律性波动^[1],全身经历相应的骨改建循环。Nielsen等^[2]和Haruyama等^[3]的实验证实,正畸牙移动与月经周期中的雌激素波动密切相关。

体外实验显示雌激素和局部受到的机械牵张都可以增加成骨细胞的增殖活性^[4],而牙周组织胰岛素样生长因子(insulin-like growth factors, IGF)在这2种增殖效应中起着重要作用,但目前的研究结果存在很多矛盾^[5]。雌激素以及正畸应力引发的骨

[收稿日期] 2007-02-26; [修回日期] 2007-06-01

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30371560)

[作者简介] 郭杰(1970-),男,山东人,副教授,博士,现在北京大学博士后流动站工作

[通讯作者] 陈扬熙, Tel: 028-85503477

改建是经过何种途径?两者之间是否存在相互作用?这些问题值得进一步的深入研究。本研究通过建立大鼠动情周期正畸牙移动的实验模型,采用核酸原位杂交技术比较雌性大鼠动情周期不同阶段牙周组织中IGF mRNA的表达变化,探讨正畸力对牙周组织IGF mRNA表达的影响。

1 材料和方法

1.1 动物模型的建立

1.1.1 实验动物及动情周期确定^[6] 3月龄Wistar雌性大鼠120只(体重300 g左右,四川大学华西实验动物中心提供),严格控制饲养条件,采用阴道涂片法确定其所处的动情周期阶段,分为动情前期、动情期、动情后期和动情间期。

1.1.2 正畸牙移动模型的建立 用King等^[7]提出的牙移动方法,装置器械包括: NiTi螺旋拉簧(直径0.12 mm)、结扎丝(直径0.025 mm)、测力计(精确度0.001 N)。加力时将NiTi螺旋拉簧用结扎丝结扎于预留的小圈上,使弹簧拉伸,利用测力计控制力值为0.5 N。在力作用下,左侧上颌第一磨牙向近中移动。

1.2 动物分组及其处理

120只实验大鼠按照处理方式随机分组,均分为假处理组、加力实验组和空白对照组。其中假处理组为戴入矫治器而不加力,每组40只。根据动情周期的不同阶段,各组又均分为动情前期、动情期、动情后期和动情间期4个亚组,每组10只。在加力实验组,动物处死后,取加力侧同颌对侧组织(未放置矫治器)设立加力自身对照对照组。

加力方式为在实验动物动情周期特定阶段(动情前期、动情期、动情后期和动情间期)戴上牙移动装置并加力,在下一个动情周期的同一阶段停止加力,结扎丝被动连续结扎中切牙和第一磨牙,保持两牙之间的距离,固定1个动情周期后,再在下一动情周期的同一阶段重新加力,如此反复4次(共7个动情周期)后在一个动情周期的同一阶段处死。

1.3 大鼠牙周组织IGF mRNA表达的原位杂交检测

实验大鼠心脏灌注后取双侧上颌骨,常规制备上颌骨及牙齿矢状向切片,厚度4 μ m,经多聚甲醛固定、体积分数为0.5%双氧水/甲醇灭活内源性过氧化物酶处理后开始原位杂交检测,操作步骤按原位杂交试剂盒(武汉博士德有限公司)说明书进行。

探针为地高辛标记的多相寡核苷酸探针, IGF- 探针序列为: 1)5'-CTTCTACCTGGCACTCTGCTTGCTCACCTT-3'; 2)5'-AAGGAAGTACACTTGAA-GAACACAAGTAGA-3'。IGF- 探针序列为: 1)5'-TGGCCTTCGCCTCGTGCTGCATTGCTGCTT-3'; 2)

5'-GCGTTCAGGGAGGCCAAACGTCACCGTCCC-3'。

最后以二氨基联苯胺显色,苏木素轻度复染。设立乳腺导管癌上皮细胞为阳性对照,预杂交液替代为阴性对照。

镜下观察并采集各实验组张力侧牙周膜中3个不同区域的染色图像, Image Proplus 4.01图像分析系统测量各组图像中阳性信号的平均光密度值,以交互方式测定3个不同区域,计算均值。

1.4 统计分析

用SPSS 11.0软件包,单因素方差分析法(one way ANOVA)比较动情周期同一阶段加力实验组与对照组的差异, Student-Newman-Keuls(S-N-K)法进行同一组内动情周期不同阶段各亚组间的两两比较。

2 结果

2.1 动情周期不同阶段各组牙周组织IGF- mRNA的测定

各组牙周组织中IGF- mRNA原位杂交的实验结果显示,成骨细胞、破骨细胞以及部分牙周膜细胞(类似未分化间充质细胞)在4个时期均可发现IGF- mRNA的阳性表达(图1~4),多散在分布于牙周膜血管周围。

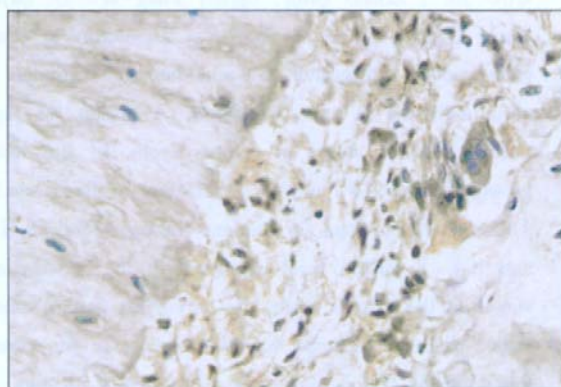


图1 加力组动情前期近中压力侧破骨细胞及部分牙周膜细胞 IGF-I mRNA阳性表达 原位杂交 $\times 400$

Fig 1 IGF-I mRNA of osteoclasts and some pericementum cells was positively stained at the pressed area of mesial periodontal tissues of tooth root after applying force during preoestrus in situ hybridization $\times 400$

大鼠动情周期不同阶段各组牙周张力侧IGF- mRNA表达的平均光密度值结果见表1。单因素方差分析及S-N-K法两两比较结果显示,在大鼠的一个动情周期中,动情前期和动情期牙周组织中IGF- mRNA表达强度与其他各阶段相比均有统计学意义,在动情前期最高($P<0.05$),动情期最低($P<0.05$),动情后期和动情间期水平相当($P>0.05$),且界于前两者之间。



图 2 加力组动情后期远中张力侧成骨细胞及血管周围部分牙周膜细胞IGF- I mRNA阳性表达 原位杂交 ×400

Fig 2 IGF- I mRNA of osteoblasts and some pericementum cells around blood vessel was positively stained at the stretched area of distal periodontal tissues of tooth root after applying force during metoestrus in situ hybridization ×400

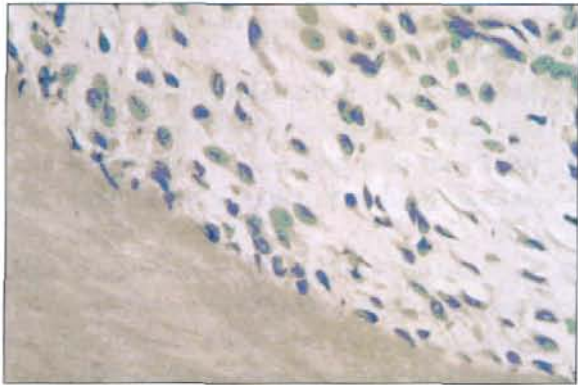


图 3 加力组动情后期远中张力侧牙周组织IGF- I mRNA阴性对照 原位杂交 ×400

Fig 3 IGF- I mRNA had not positively stained in negative control section at the stretched area of distal periodontal tissues of tooth root after applying force during metoestrus in situ hybridization ×400

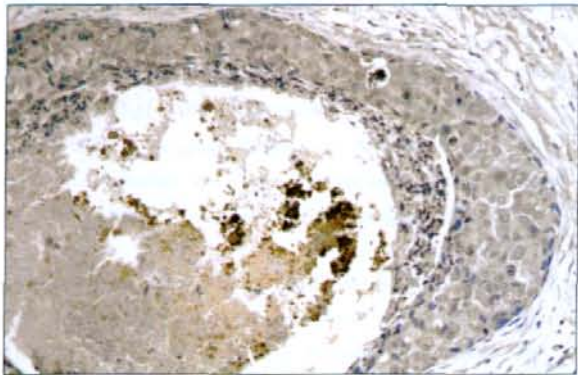


图 4 人乳腺导管癌细胞IGF- I mRNA强阳性表达 原位杂交 ×400

Fig 4 IGF- I mRNA of canceration duct epithelium of human lacteal gland was strongly stained in situ hybridization ×400

结果显示，成骨细胞、破骨细胞以及部分牙周膜细胞(类似未分化间充质细胞)均可发现IGF- mRNA阳性信号，多散在分布于牙周膜血管周围。

大鼠动情周期不同阶段各组牙周组织IGF- mRNA表达的平均光密度值结果见表2。单因素方差分析及S- N- K法两两比较结果显示动情周期同一阶段加力组与对照组相比，牙周组织中IGF- mRNA表达强度增高($P<0.05$)，但动情周期不同阶段牙周组织IGF- mRNA表达强度没有差别($P>0.05$)。

表 1 各组牙周组织IGF- mRNA表达平均光密度值

Tab 1 Optical density value of IGF- mRNA expression of periodontal tissues of test and control groups

实验组别	IGF- mRNA表达的平均光密度值			
	动情前期	动情期	动情后期	动情间期
A	233.11 ±4.57	155.14 ±8.85	188.16 ±5.58	192.05 ±6.34
B	241.08 ±5.97	147.92 ±7.53	185.87 ±5.16	187.65 ±5.47
C	243.37 ±5.50	149.69 ±7.66	191.47 ±6.97	191.55 ±6.45
D	257.32 ±7.56	160.29 ±6.73	196.61 ±7.49	203.07 ±9.94

注：A空白对照组；B假处理组；C加力自身对侧对照组；D加力实验组

表 2 各组牙周组织IGF- mRNA表达的平均光密度值

Tab 2 Optical density value of IGF- mRNA expression of periodontal tissues of test and control groups

实验组别	IGF- mRNA表达的平均光密度值			
	动情前期	动情期	动情后期	动情间期
A	206.78 ±5.57	204.33 ±8.10	199.99 ±12.25	200.72 ±11.25
B	202.99 ±8.86	204.90 ±8.68	200.77 ±7.05	200.20 ±9.49
C	207.69 ±8.49	207.01 ±11.05	200.23 ±11.51	207.68 ±10.01
D	275.13 ±10.89	272.87 ±9.37	272.40 ±10.88	275.52 ±12.44

注：A空白对照组；B假处理组；C加力自身对侧对照组；D加力实验组

3 讨论

IGF- 和IGF- 可以自分泌/旁分泌形式在局部发挥作用，这些因子可能比血循环来源的发挥更大作用^[9]。本研究显示，牙周组织中，成骨细胞、破骨细胞及部分牙周膜细胞均有IGF- 和IGF- mRNA表达，阳性部分多散在分布于牙周膜血管周围，提示IGF在骨组织修复早期影响了牙周膜未分化间充质细胞的化学趋向性，使其向修复区域迁移^[9]。

在女性月经周期中雌激素水平发生波动，雌激素水平与循环中IGF- 密切相关^[10]，但在以往的实验结论中相互矛盾。Thierry van Dessel等^[11]认为

2.2 动情周期不同阶段各组牙周组织IGF- mRNA的测定
各组牙周组织中IGF- mRNA原位杂交的实验

IGF- β 和IGF- α 在血液循环中的水平不依赖于月经周期。与此相对立的结论表明,血清中的IGF- β 随着月经周期波动^[12],而大鼠肝脏组织的IGF-mRNA在动情间期最高^[13],IGF- β 更多地受到局部组织环境的调节^[14]。在与本实验同一实验模型的前期实验中,无论选择动情周期的哪一个阶段进行加力,血清中雌二醇的含量均会升高^[15]。从本实验结果中可以看出,大鼠动情周期不同阶段牙周组织中IGF-mRNA的表达有规律,在动情期最低,动情前期最高,而在动情后期和动情间期相当,且介于前二者之间,这可能与动情周期中血清雌激素含量呈波动性变化有关,而IGF-mRNA的表达强度与大鼠所处的动情周期的阶段无明显关系。

在以往的实验中牵张对体外成骨细胞表达IGF影响的结果不尽相同。短暂的剧烈运动也可以增加月经周期中每一阶段循环中的生长激素,使循环中的IGF- β 迅速升高^[16],这与Lean等^[17]学者的体外实验结果相吻合,说明了IGF- β 在骨受到负荷后的成骨反应中起作用。但是牵张引起的ROS 17/2.8成骨样细胞增殖伴随有条件培养基中4倍的IGF- β 增加,但不能增加条件培养基中的IGF- β ,说明牵张所致ROS 17/2.8细胞增殖通过的是IGF- α 途径^[4]。Damien等^[18]研究结果也说明牵张所致的成骨细胞增殖效应通过IGF- α 途径,而雌激素则通过IGF- β 途径。

本研究结果显示,选择动情周期的任一阶段加力,加力实验组与各对照组相比,牙周组织中IGF-mRNA的表达强度增高($P<0.05$)。说明局部张力可以上调IGF mRNA表达。不同的是,IGF- α 的表达除了与牵张引起的牙周组织改建有关外,在动情周期中的表达也存在一定的规律,动情前期最高,动情期最低,说明正畸牙移动与雌性大鼠动情周期的全身状态有关。IGF-mRNA的表达强度没有显示出随着动情周期变化的规律,引起正畸牙移动的局部机械刺激直接导致局部IGF-mRNA的表达增强。

[参考文献]

[1] Carandente F, Angeli A, Candiani GB, et al. Rhythms in the ovulatory cycle. 2nd: LH, FSH, estradiol and progesterone[J]. *Chronobiologia*, 1989, 16(4): 353-363.

[2] Nielsen HK, Brixen K, Bouillon R, et al. Changes in biochemical markers of osteoblastic activity during the menstrual cycle[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1990, 70(5): 1431-1437.

[3] Haruyama N, Igarashi K, Saeki S, et al. Estrous-cycle-dependent variation in orthodontic tooth movement[J]. *J Dent Res*, 2002, 81(6): 406-410.

[4] Cheng M, Zaman G, Rawlinson SC, et al. Mechanical strain stimulates ROS cell proliferation through IGF- α and estrogen through IGF- β [J]. *J Bone Miner Res*, 1999, 14(10): 1742-1750.

[5] Zaman G, Suswillo RF, Cheng MZ, et al. Early responses to dynamic strain change and prostaglandins in bone-derived cells in culture[J]. *J Bone Miner Res*, 1997, 12(5): 769-777.

[6] Montes GS, Luque EH. Effects of ovarian steroids on vaginal smears in the rat[J]. *Acta Anat(Basel)*, 1988, 133(3): 192-199.

[7] King GJ, Keeling SD, McCoy EA. 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.

[8] Isgaard J, Möller C, Isaksson OG, et al. Regulation of insulin-like growth factor messenger ribonucleic acid in rat growth plate by growth hormone[J]. *Endocrinology*, 1988, 122(4): 1515-1520.

[9] Fiedler J, Brill C, Blum WF, et al. IGF- α and IGF- β stimulate directed cell migration of bone-marrow-derived human mesenchymal progenitor cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 345(3): 1177-1183.

[10] McCarthy TL, Ji C, Shu H, et al. 17 β -estradiol potently suppresses cAMP-induced insulin-like growth factor- α gene activation in primary rat osteoblast cultures[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(29): 18132-18139.

[11] Thierry van Dessel HJ, Chandrasekhar Y, Yap OW, et al. Serum and follicular fluid levels of insulin-like growth factor (IGF- α), IGF- β , and IGF-binding protein-1 and -3 during the normal menstrual cycle[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996, 81(3): 1224-1231.

[12] Juul A, Scheike T, Pedersen AT, et al. Changes in serum concentrations of growth hormone, insulin, insulin-like growth factor and insulin-like growth factor-binding proteins 1 and 3 and urinary growth hormone excretion during the menstrual cycle[J]. *Hum Reprod*, 1997, 12(10): 2123-2128.

[13] Sahlin L, Norstedt G, Eriksson H. Estrogen regulation of the estrogen receptor and insulinlike growth factor- α in the rat uterus: A potential coupling between effects of estrogen and IGF- α [J]. *Steroids*, 1994, 59(7): 421-430.

[14] Jesionowska H, Hemmings R, Guyda HJ, et al. Determination of insulin and insulin-like growth factors in the ovarian circulation [J]. *Fertil Steril*, 1990, 53(1): 88-91.

[15] 郭杰, 车晓霞, 赵青, 等. 正畸牙移动与女性月经周期关系的动物实验研究[J]. *上海口腔医学*, 2007, 16(2): 187-191.

GUO Jie, CHE Xiao-xia, ZHAO Qing, et al. An experimental study on the relationship between the orthodontic tooth movements and menstrual cycle[J]. *Shanghai J Stomatol*, 2007, 16(2): 187-191.

[16] Hornum M, Cooper DM, Brasel JA, et al. Exercise-induced changes in circulating growth factors with cyclic variation in plasma estradiol in women[J]. *J Appl Physiol*, 1997, 82(6): 1946-1951.

[17] Lean JM, Mackay AG, Chow JW, et al. Osteocytic expression of mRNA for c-fos and IGF- α : An immediate early gene response to an osteogenic stimulus[J]. *Am J Physiol*, 1996, 270(6 Pt 1): E937-E945.

[18] Damien E, Price JS, Lanyon LE. Mechanical strain stimulates osteoblast proliferation through the estrogen receptor in males as well as females[J]. *J Bone Miner Res*, 2000, 15(11): 2169-2177.