

# 骨碎补对牙周炎大鼠正畸牙移动保持阶段 RANKL 表达影响的研究

宋佳,赵刚,宋春蕾

(佳木斯第二附属口腔医院正畸科,黑龙江 佳木斯 154007)

**摘要:**目的 研究牙周炎的大鼠牙齿移动保持阶段,中药骨碎补对牙槽骨成骨作用以及对 RANKL 表达影响的研究。方法 将 45 只雄性 Wister 大鼠建立牙周炎实验模型。按照随机数字表法将大鼠分成 9 个组,每组 5 只,进行标记。其中 1 组设为空白组,4 组对照组,4 组实验组。空白组拉簧牵拉上颌左侧第一磨牙向近中移动,牵拉 21 d 后分别在保持 3,7,14,21 d 处死;实验组和对照组分别建立牙移动模型,实验组在保持阶段的 3,7,14,21 d 的前 1 天灌服骨碎补水煎液 0.9 g/kg,1 次/d;对照组同样时间灌服等量 0.9%氯化钠溶液,1 次/d。HE 染色观察成骨细胞和破骨细胞。免疫组织化学切片观察 RANKL 因子表达量。结果 实验组的 RANKL 表达量在初期先增加,从第 7 d 开始 RANKL 表达量开始逐渐降低。同一节点对比,实验组 RANKL 表达量低于对照组。实验组在保持第 21 d RANKL 表达量非常少,牙周膜处于稳定状态,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。结论 骨碎补水煎液可以促进成骨,稳定牙槽骨及牙周膜的改建,降低 RANKL 的表达。

**关键词:**骨碎补;牙周炎;牙移动;RANKL

中图分类号:R781.4

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2019.04.028

文章编号:1006-1959(2019)04-0085-03

## Effect of Drynaria on the Expression of RANKL in the Period of Orthodontic Tooth Movement in Rats with Periodontitis

SONG Jia,ZHAO Gang,SONG Chun-lei

(Department of Orthodontics,the Second Affiliated Stomatological Hospital,Jiamusi 154007, Heilongjiang,China)

**Abstract:**Objective To study the effect of Chinese medicine granules on the alveolar bone osteogenesis and the expression of RANKL in periodontitis rats. Methods 45 male Wister rats were established experimental models of periodontitis. Rats were divided into 9 groups according to the random number table method, and 5 rats in each group were labeled. One group was set as blank group, 4 groups were control group, and 4 groups were experimental group. The blank group was pulled to pull the first molar on the left side of the upper jaw and moved to the middle. After 21 d of pulling, the rats were sacrificed for 3, 7, 14 and 21 d. The tooth movement model was established in the experimental group and the control group respectively. The experimental group was given 0.9 g/kg of decoction of bone decoction once a day, 3, 7, 14, 21 d of the maintenance phase, once a day; The control group was given the same amount of 0.9% sodium chloride solution once a day for the same time. Osteoblasts were observed by HE staining. Immunohistochemical sections were used to observe the expression level of RANKL factor. Results The expression level of RANKL in the experimental group increased first, and the expression level of RANKL began to decrease gradually from the 7th day. Compared with the same node, the expression level of RANKL in the experimental group was lower than that in the control group. In the experimental group, the expression of RANKL was very low at 21 d and the periodontal ligament was stable, the difference was statistically significant ( $P<0.05$ ). Conclusion Wound decoction can promote osteogenesis, stabilize the alveolar bone and periodontal ligament, and reduce the expression of RANKL.

**Key words:** Orthodontic; Periodontitis; Tooth movement; RANKL

口腔正畸治疗牙周病可以减轻患牙松动度、改善病患的出血情况,降低病患牙周袋深度<sup>[1]</sup>。但是正畸牙移动后,牙周膜纤维组织改建较慢并有恢复趋势,很容易使牙齿发生移动。目前对牙周病正畸治疗后保持阶段研究较少。中药骨碎补具有强骨、止痛的功效。现已被制成多种制剂用于牙齿松动、跌扑闪挫、筋骨折伤<sup>[2]</sup>。转录因子 NF- $\kappa$ B 受体活化剂配体(receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand,RANKL)是参与骨改建的重要细胞因子之一。成骨细胞和基质细胞均表达 RANKL 和 OPG,都能与破骨细胞表面的 RANK 结合,RANKL 与破骨细胞细胞膜上的 RANK 结合,促进破骨细胞的分化成熟,并且抑制破骨细胞的凋亡<sup>[3]</sup>。本研究通过给患有牙周炎正畸牙移动保持阶段的大鼠灌服水煎骨碎补中药,用免疫

组化检测 RANKL 因子的表达,探讨中药骨碎补在牙周炎正畸牙移动后保持阶段对牙周膜及牙槽骨的改建作用,为缩短牙周炎正畸患者保持时间提供实验依据。

### 1 材料与方法

**1.1 材料** 每 2000 ml 水中加 20 g 骨碎补(购于黑龙江省佳木斯中医院)浸泡 30 min,加热至沸腾半个小时后滤渣,将滤液浓缩至 200 ml,即制成 100%浓度的水煎剂。

**1.2 实验动物** 选择清洁级 Wistar 大鼠,雄性,体重(180~220 g)45 只[购于佳木斯大学动物实验中心,许可证号 SCXK(黑)2013-001],按照《实验动物保护条例》饲养,消毒,清理,喂养无菌饲料(由佳木斯动物实验中心提供),饲养 1 周后开始动物实验。

### 1.3 方法

**1.3.1 分组** 按照随机数字表法将大鼠分成 9 个组,每组 5 只,进行标记。其中 1 组设为空白组,4 组对照组,4 组实验组。牙周炎组建立牙周炎模型,注射

作者简介:宋佳(1992.6-),女,黑龙江鹤岗人,硕士,住院医师,主要从事口腔正畸方面的研究

通讯作者:赵刚(1975.8-),男,黑龙江佳木斯人,硕士,主任医师,教授,科主任,主要从事口腔正畸方面的研究

过量 10% 的水合氯醛处死, HE 染色及免疫组化染色。实验组和对照组建立牙周炎及正畸牙移动模型, 实验组灌服骨碎补水煎液, 对照组灌服等量的 0.9% 氯化钠溶液。分别在第 3, 7, 14, 21 d 处死, HE 染色及免疫组化染色。

**1.3.2 实验动物模型建立** 牙周炎动物模型建立: 用 10% 水合氯醛 3.5 ml/kg (100 ml, 雷根生物供应室, 实验使用), 腹腔麻醉, 仰卧位固定, 上开口器 (用 0.9 mm 不锈钢弯制), 用探针 (口腔器械盒, 保定市医疗器械有限公司) 将大鼠上颌左侧第一磨牙牙龈剥离。在大鼠上颌左侧第一磨牙近中牙颈部龈沟处用快速手机 (402 高速手机, 顺逊医疗器械) 磨 0.2 mm 深固位沟, 选用 0.20 mm 结扎丝 (杭州奥索医疗器械有限公司) 将大鼠上颌左侧第一磨牙结扎 (尽量结扎到牙龈沟处)。给大鼠喂养高糖水 (100 g/L), 将饲料 (佳木斯大学动物实验中心提供) 泡软, 为期 1 个月。1 个月观察可见上颌第一磨牙牙龈红肿、探诊出血、牙周袋, 即牙周炎动物模型建立成功。

正畸牙移动模型建立: 将大鼠麻醉, 固定, 大鼠上颌两颗中切牙颈部的远中面磨出深 0.2 mm 的固位沟, 拉簧 (镍钛合金牙齿矫形拉簧, 北京圣玛科技有限公司) 一侧连接大鼠磨牙, 另一侧与大鼠切牙连接。测力计 (杭州奥索牙用测力计杆式测力计, 50/格) 测拉力约 50 g, 加力 21 d。建立保持期模型, 用结扎丝连扎大鼠第一磨牙及切牙, 保持第一磨牙移动后位置。在加力装置去除前 1 d 开始灌服。实验组灌服骨碎补水煎液 (中医院购买, 制备成 0.9 g/kg 溶液), 对照组灌服等量的 0.9% 氯化钠溶液。分别在 3, 7, 14, 21 d 处死大鼠。

**1.3.3 免疫组化及 HE 染色** 取大鼠左侧上颌骨, 在 4% 多聚甲醛固定液 (北京华越洋生物科技有限公司) 固定 24 h。在 EDTA 溶液中 4℃ 脱钙 50 d。PBS 冲洗干净、石蜡包埋, 与牙体长轴平行切片, 取牙齿近远中组织切片免疫组化。①HE 染色: 烤片, 二甲苯脱蜡 25 min, 苏木素浸泡 3 min 染色, 淡氨水反蓝, 冲洗, 0.5% 伊红浸泡 2 min, 冲洗, 梯度乙醇脱水, 中性树胶封片。②免疫组化染色: 烤片, 二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化, 室温下使用复合酶消化液, 滴加抗原修复液 I, 充分暴露抗原, 用 3% 过氧化氢孵育以阻断内源性过氧化物酶活性, 滴加二抗, DAB 溶液显色, 电镜下观察抗原抗体, 梯度乙醇脱水, 中性树胶封片。

**1.4 评价标准** RANKL 表达量用平均光密度值, 每个组织切片随机分析片子上、中、下三个不同部位的高倍镜视野, 测量其平均值, 测量值越大, RANKL 表达越多。观察免疫组化切片可见, RANKL 的阳性表达集中在大鼠牙槽骨骨髓基质细胞中, 胞膜、胞质及

核膜都被染色, 呈棕黄色颗粒状<sup>[4]</sup>。

**1.5 统计学分析** 使用 GraphPad prism 5.0 软件对数据统计分析, 计量资料用 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 比较采用 *t* 检验; 计数资料以 (%) 表示, 采用  $\chi^2$  检验。采取多因素方差方法分析比较时间和药物因素对 RANKL 表达的影响,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

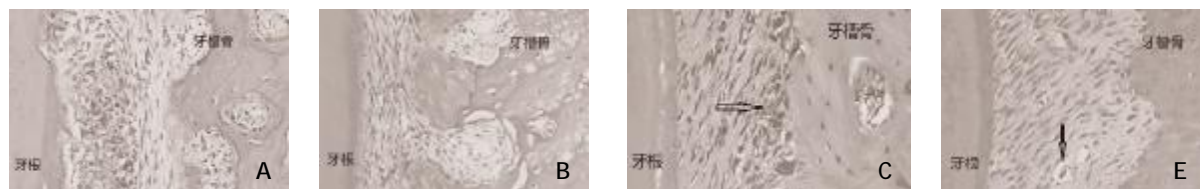
**2.1 HE 染色结果** 动物实验模型初期, 可见牙周膜纤维界限模糊不清, 牙周纤维拉长。在第 3 天时可见破骨细胞以及成骨细胞团, 牙根处牙周膜内可见成骨细胞 (图 1A、1B), 实验组牙周纤维排列规律, 而对照组牙周纤维紊乱, 但差异不明显。在第 7 天开始到第 21 天, 牙周膜宽度逐渐缩小, 纤维排列稳定, 出现大量的成骨样细胞。对照组牙周纤维比较紊乱, 存在成骨细胞的同时也存在大量的破骨样细胞。在保持的第 21 天, 实验组可见细胞大部分处于稳定的状态且看到成骨细胞 (图 1D), 对照组牙周膜细胞排列紊乱 (图 1C)。

**2.2 免疫组织化学染色结果** RANKL 因子主要表达在牙周膜及牙槽骨的细胞膜及细胞浆等部位, 阳性的表达结果变现为黄色或黄棕色, 淡蓝色为阴性表达, 白色是底色。在保持开始到第 7 d, 可见 RANKL 因子大量表达 (图 2E、F)。随着保持时间延长, 可见 RANKL 因子表达量逐渐降低, 并且出现阴性表达。在保持第 21 d 对照组可见吸收陷窝 (图 G), 第 21 d 实验组 RANKL 因子表达量微乎其微并出现大部分淡蓝色阴性表达, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 1、图 H。

## 3 讨论

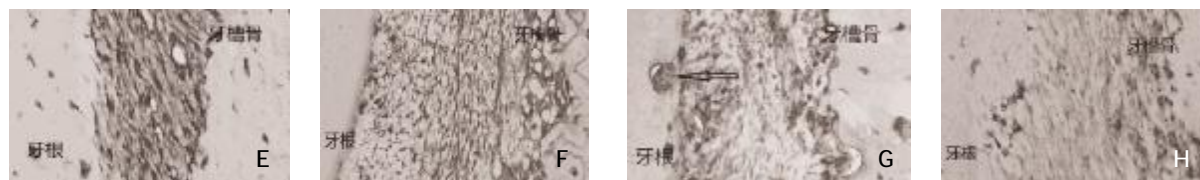
牙周炎是牙龈炎未得到及时治疗, 导致炎症由牙龈向深层扩散到牙周膜、牙槽骨和牙骨质而发展引起的牙周组织的慢性炎症, 严重时牙齿将不能保留<sup>[5]</sup>。近年来有学者<sup>[6]</sup>将正畸治疗导入牙周病的综合治疗系列, 即在牙周炎症控制的基础上, 通过完善的正畸治疗排齐牙列, 恢复正常邻接关系, 咀嚼功能。因此从正畸学角度来说, 需要考虑牙周炎患者正畸治疗结束后的保持。目前, 物理方法保持有: Hawley 保持器、压膜式透明保持器、固定式舌侧保持器是临床中 3 种常用<sup>[7]</sup>。有研究应用一些强筋壮骨的中药可以促进成骨, 促进正畸牙移动后的稳定, 如仙灵骨葆可以抑制成年大鼠牙移动保持阶段破骨细胞生成, 促进成骨细胞的生成<sup>[8]</sup>。

中药骨碎补的主要成分为: 木栓,  $\beta$ -香树脂醇,  $\beta$ -谷甾醇等<sup>[9]</sup>。研究表明, 骨碎补及有效成分通过提高 BMP-2 蛋白和抑制 RANKL 的表达实现促进成骨细胞增殖分化和抑制破骨细胞活性的作用<sup>[10]</sup>。此外骨碎补有骨细胞保护作用、抗骨质酥松作用等<sup>[11]</sup>。



注:图 A:见成骨细胞并且牙周膜界限紊乱;图 B:见牙周膜增宽;图 C:已形成成骨细胞团;图 D:牙周膜开始恢复

图 1 HE 染色( $\times 200$ )



注:图 E:见 RANKL 因子大量表达;图 F:可见 RANKL 因子表达及牙周膜增宽;图 G:见牙根及牙槽骨吸收陷窝;图 H:见大量淡蓝色阴性表达、RANKL 因子减少

图 2 免疫组织化学染色( $\times 200$ )

表 1 不同时间点 RANKL 在实验组与对照组中的平均光密度值表达 ( $n=20, \bar{x} \pm s$ )

组别	0 d	3 d	7 d	14 d	21 d
对照组	0.1721 $\pm$ 0.0045	0.2411 $\pm$ 0.0198	0.2493 $\pm$ 0.0252	0.2171 $\pm$ 0.0057	0.2047 $\pm$ 0.0127
实验组	0.1753 $\pm$ 0.0037	0.2170 $\pm$ 0.0097	0.2137 $\pm$ 0.0089*	0.1928 $\pm$ 0.0052*	0.1818 $\pm$ 0.0053*

注:\*与对照组比较,  $P < 0.05$

陈莉丽等<sup>[12]</sup>发现在豚鼠牙齿畸形模型中,骨碎补能显著改善齿骨密度,使牙齿坚硬度增强,促进牙骨细胞的进一步合成。许彦枝等<sup>[13]</sup>研究发现骨碎补作用的人牙龈成纤维细胞生长分泌功能活跃、矿化能力增强。RANKL 可促进破骨细胞的分化,增强成熟破骨细胞的活力,阻止破骨细胞凋亡,是破骨细胞分化成熟和维持功能所需的重要因子<sup>[14]</sup>。当 RANKL 表达量增加,破骨细胞分化激活成熟,牙周膜改建中。当 RANKL 表达量降低,破骨细胞分化受到抑制,停止骨吸收。

本研究中在保持阶段初期,牙周膜不稳定, RANKL 表达量出现增加现象。随着保持时间的延长,牙周膜开始稳定于新的位置, RANKL 表达量逐渐降低。灌服中药骨碎补水煎液的实验组 RANKL 因子降低快且大。在保持阶段第 21 d,实验组 RANKL 表达量降低接近于空白组,但比空白组 RANKL 表达量略高。说明中药骨碎补对 RANKL 表达有抑制作用,促进骨改建成骨,促进牙周膜稳定。

综上所述,中药骨碎补对牙周膜改建有促进作用,抑制破骨 RANKL 因子的表达。若中药骨碎补应用于临床可减少牙周炎患者物理保持的时间,从而达到更好的治疗效果,及提高稳定性。

#### 参考文献:

- [1] 邓昊,周立辉,鲜文,等.口腔正畸治疗牙周病致前牙移位的临床疗效观察[J].现代生物医学进展,2015,15(9):1732-1734, 1743.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[M].北京:中国医药科技出版社,2010:121.
- [3] 黎彦龙,何明,陈秉雄,等.OPG-RANKL-RANK 信号系统

是调节破骨细胞及骨质疏松症的重要途径[J].中国组织工程研究,2015,19(24):3894-3898.

[4] 钟雯怡,武岐山,高丽,等.重组人骨保护素对牙周炎大鼠牙槽骨 RANKL、OPG 蛋白表达的影响[J].重庆医学,2015,44(14):1879-1881.

[5] 曹雨庵.牙周炎正畸治疗患者治疗前后炎性及牙周状态的变化[J].海南医学院学报,2014,20(11):1598-1600.

[6] Azouni KG, Tarakji B. The Trimeric Model: A New Model of Periodontal Treatment Planning [J]. J Clin Diagn Res, 2014, 8(7): ZE17-ZE20.

[7] 林建昌,赖文莉.3 种常用正畸保持器的特点及临床应用[J].国际口腔医学杂志,2015,42(4):462-465.

[8] 陆廷茂,张军梅.仙灵骨葆对大鼠正畸保持阶段成骨细胞和破骨细胞的影响[J].贵州医药,2016,40(8):820-821.

[9] Saravanan S, Mutheeswaran S, Saravanan M, et al. Ameliorative effect of *Drynaria quercifolia* (L.) J. Sm., an ethnomedicinal plant, in arthritic animals[J]. Food Chem Toxicol, 2013, 51: 356-363.

[10] 殷方明,肖连波,张昀.骨碎补柚皮苷对炎症及骨作用的相关研究进展[J].中国骨伤,2015,28(2):182-186.

[11] 钱茜.骨碎补化学成分和药理作用研究进展[J].中国生化药物杂志,2015,35(3):186-188.

[12] 陈莉丽,唐琪,严杰.骨碎补提取液对实验性牙槽骨吸收疗效的研究[J].中国中药杂志,2004,29(6):549-553.

[13] 许彦枝,高永博,郭晶洁,等.骨碎补对体外培养人牙髓细胞增殖及超微结构的影响[J].中国医院药学杂志,2007,27(10):1377-1380.

[14] 黎彦龙,何明,陈秉雄,等.OPG-RANKL-RANK 信号系统是调节破骨细胞及骨质疏松症的重要途径[J].中国组织工程研究,2015,19(24):3894-3898.

收稿日期:2018-10-30;修回日期:2018-11-20

编辑/肖婷婷