

· 论 著 ·

## 大鼠正畸牙根吸收修复早期 BMP-2 与 BSP 表达的研究

张琳林, 戴红卫, 张定铭, 任媛姝, 邹林洪, 吴 杨<sup>△</sup>

(重庆医科大学附属口腔医院正畸科 400015)

**摘要:**目的 观察 SD 大鼠正畸牙根吸收早期修复过程中牙周组织骨形成蛋白-2(BMP-2)、骨涎蛋白(BSP)的表达。方法 选取 48 只雄性 SD 大鼠, 正畸加力 14 d 后拆除矫治器, 在装置拆除后分别在 0、1、3、5、7、10、14、28 d 处死, HE 染色观察牙周组织形态学变化, 用免疫组织化学法检测 BMP-2、BSP 的表达。结果 BMP-2、BSP 的表达在矫治器拆除后开始升高, BMP-2 在第 1 天时达到最高, BSP 在第 3 天时达到最高, 然后逐渐下降, 到第 28 天时降至对照组水平。结论 BMP-2、BSP 的浓度在牙周组织中选择性地表达升高, 反映了矫治器拆除后牙周组织的修复过程活跃。

**关键词:**牙根吸收; 牙根修复; 骨形成蛋白-2; 骨涎蛋白; 正畸牙移动; SD 大鼠

中图分类号: R365.783

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)10-1214-03

## Study of BMP-2 and BSP in early reparative process of orthodontical tooth resorption in rats

ZHANG Lin-lin, DAI Hong-wei, ZHANG Ding-ming, et al.

(Department of Orthodontics, Affiliated Hospital of Stomatology, Chongqing Medical University, Chongqing 400015, China)

**Abstract: Objective** To investigate changes of BMP-2 and BSP during cementum repair following experimentally induced tooth movement, and to characterize the cells taking part in the regenerative process of SD rat. **Methods** After 14 d treatment, the appliance was removed, 48 male SD rats were killed in groups on 0, 1, 3, 5, 7, 10, 14, 28 d. Routine histological staining for viewing changes of periodontium histomorphology, immunohistochemical staining for bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) and bone sialoprotein (BSP) were conducted. **Results** Expression of BMP-2 and BSP were increased notably immediately after withdrawing the coils. BMP-2 peaked on 1 d, BSP peaked on 3 d, then decreased to the level in the control group on 28 d. **Conclusion** The concentration of BMP-2 and BSP is preferentially expressed strongly intensity, which shows that the repair process is active after withdrawing force.

**Key words:** root resorption; root repair; BMP-2; BSP; sprague-dawley rats

正畸导致的炎性牙根吸收是正畸治疗常见的并发症。正畸机械矫治力导致牙齿移动过程中, 牙周组织受机械力的作用发生牙槽骨的改建和牙周膜组织的更新, 引起不同程度的牙根吸收。骨形成蛋白-2 (bone morphogenetic protein 2, BMP-2) 是骨折修复时的启动因子, 通过自分泌或旁分泌信号传递发挥作用。BMP-2 能刺激间充质细胞的分化、加强细胞外基质合成, 维持成骨细胞分化标志如骨桥蛋白、骨钙素、碱性磷酸酶的表达<sup>[1]</sup>。骨涎蛋白 (bone sialoprotein, BSP) 是成骨细胞分化成熟的标志<sup>[2]</sup>。BSP 是牙骨质主要的非胶原蛋白 (non-collagenous proteins, NCPs), 也是成牙骨质细胞重要的矿化相关蛋白, 是研究牙骨质形成的一个重要标志性蛋白, 在牙骨质形成过程中发挥重要作用。关于牙根吸收后修复的研究多是集中在临床方面, 基础研究严重不足。本研究以 SD 大鼠为实验对象, 通过观察 BMP-2、BSP 在大鼠正畸加力终止后不同时间段牙周组织中的表达, 探讨 BMP-2、BSP 在成牙骨质细胞修复活动中的变化规律和所起的作用。

## 1 材料与方 法

**1.1 动物与主要试剂** 48 只健康雄性 12 周龄成年 SD 大鼠 (重庆医科大学实验动物中心提供), 质量 (250±10) g; BMP-2 单克隆抗体、BSP 单克隆抗体、SABC 免疫组化二抗试剂盒、DAB 显色系统、多聚赖氨酸 (武汉博士德生物工程有限公司)。

## 1.2 动物模型的建立

**1.2.1 正畸牙根吸收修复模型的建立与实验分组** 将 48 只 SD 大鼠按随机数字表法随机分为 8 个实验组 (牙根修复 0、1、3、5、7、10、14、28 d 组), 每组 6 只, 设置自身对照, 对照组取对侧未加力侧。实验过程中, 每天对大鼠质量进行记录。标准定量软食, 自由饮水。

**1.2.2 模型建立** 选左侧上颌磨牙为实验侧。10% 水合氯醛按 3 mL/kg 的比重对大鼠进行腹腔注射麻醉。麻醉后仰卧固定于特制的鼠板上, 用金刚砂针沿在左侧上前牙唇舌远中三面和左侧第一磨牙近中轴面角龈缘磨出深约 0.2 mm 浅凹, 在大鼠上颌左侧第一磨牙与上切牙之间安置一闭隙镍钛弹簧, 用测力器测定矫治器施加 0.5 N (50 g) 力, 弹簧两侧分别用 0.2 mm 细结扎丝固定。严密监控大鼠矫治器, 若有损坏或脱落, 及时更换安装。持续施力 14 d 后拆除装置。

**1.3 标本制备** 标本预备: 分别于装置拆除后第 0、1、3、5、7、10、14、28 天将 SD 大鼠麻醉, 用 4% 的多聚甲醛 (pH 7.2~7.4) 行心内灌注, 内固定样本组织, 取实验大鼠上颌骨实验侧第一磨牙及其周围牙槽骨的组织块, 置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 24 h, 然后用蒸馏水漂洗 1 min, 4℃ 下放入 100 g/L 乙二胺四乙酸 (EDTA) 脱钙剂 (pH 7.2~7.4) 中, 脱钙 6~8 周, 去除多余组织块, 保留磨牙及周围组织, 流水冲洗, 梯度乙醇脱

<sup>△</sup> 通讯作者, 电话: (023)89035737; E-mail: dai\_tg@yahoo. cn。

水,二甲苯透明,石蜡浸渍包埋。沿牙体长轴,将标本按牙齿近远中矢状方向通过牙齿中央窝髓腔的中轴层面连续切片,切片约 4 μm 厚,裱于经多聚赖氨酸处理过的玻片上。免疫组化 SABC 法:用 PBS 代替一抗做阴性对照,操作步骤按试剂盒说明书进行。阳性标准:细胞形态完整,结构清晰,胞浆或胞膜为特异性棕黄色,阳性细胞着色水平明显高于背景水平。

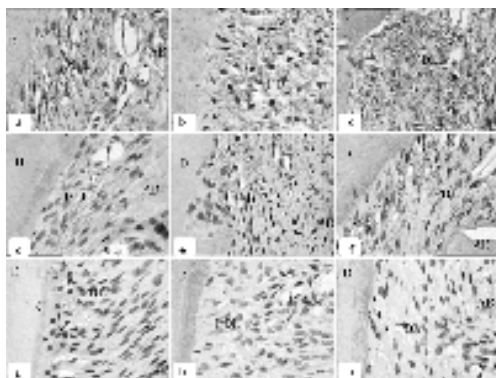
**1.4 图像分析** 采用计算机图像分析系统 Image-Pro Plus 6.0 分别对对照组和不同时期实验组 BMP-2、BSP 的表达强度进行分析。BMP-2、BSP 的阳性强度用平均光密度值表示。每个动物选用一张切片,每张切片随机选取第一磨牙近远中根尖 1/3 的 5 个不重叠视野,以平均值作为阳性细胞光密度值,消除误差。

**1.5 统计学方法** 采用 SPSS16.0 软件对重复测量数据进行 t 检验,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

**2 结 果**

在实验过程中,大鼠均健康,摄食饮水均未受到正畸的影响,所有大鼠在处死前体重均有增长。其中 1 只在上矫治器后第 4 天镍钛拉簧脱落,排除治疗,另补充标本。

**2.1 苏木精-伊红染色** 对照组:显微镜下切片均未见明显牙根吸收和成骨活动,偶见位于牙槽骨吸收陷窝内的多核破骨细胞。大鼠第一磨牙近中根近远中两侧牙周间隙均匀,宽度接近,牙周膜纤维排列规则,牙骨质表面平整连续。实验组:第一磨牙近中根根尖 1/3 区域以及根分叉附近可见:第 0 天组牙槽骨可见显著的吸收现象,牙骨质发生不同程度吸收,牙骨质表面和吸收陷窝分布着大量多核破骨骨质细胞。牙周纤维排列紊乱,可见玻璃样变。随着矫治器拆除时间延长,牙槽骨吸收逐渐停止,破骨细胞减少,成骨细胞增多,出现新沉积的类骨质,新生牙骨质形成。牙周胶原纤维增生,牙周间隙逐渐恢复正常。到 28 d 时,新生牙槽骨进一步钙化,牙骨质表面比较光滑,牙周膜纤维排列逐步恢复正常,见图 1。



a,b,c,d,e,f,g,h,i 分别代表实验第 0,1,3,5,7,10,14,28 天和对照组(C:牙骨质,D:牙本质,AB:牙槽骨,PDL:牙周膜)。

图 1 牙根吸收修复早期 HE 染色图(×400)

**2.2 免疫组化**

**2.2.1 BMP-2** 对照组:牙周膜成纤维细胞、成骨细胞、成牙骨质细胞等的胞浆中有 BMP-2 的弱阳性表达,髓周前期牙本质层染色阳性,牙槽骨、根尖部细胞牙骨质区域少见阳性染色细胞。实验组:BMP-2 表达定位于细胞浆和细胞膜中,以细胞浆为主。牙周膜成纤维细胞、成骨细胞、成牙骨质细胞均可见 BMP-2 阳性染色,髓周前期牙本质层染色阳性,牙槽骨有阳性

表达,近中牙周膜比远中牙周膜表达明显。于第 1 天阳性表达达到峰值,与对照组比较染色强度大,差异有统计学意义,第 3 天起开始下降,第 28 天时呈弱阳性表达,见图 2。实验结果见表 1。

表 1 不同时间实验组和对照组 BMP-2 组化染色平均光密度值(̄x±s)

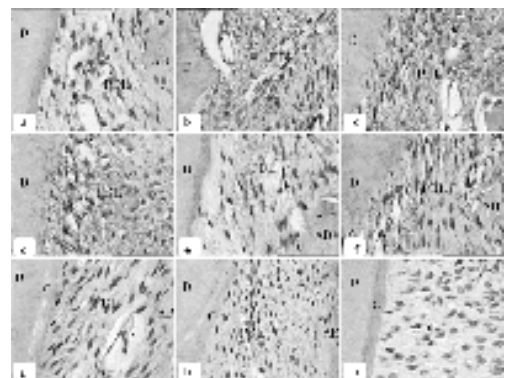
时间(d)	实验组	对照组
0	0.092 8±0.003 6*	0.043 4±0.002 2
1	0.163 6±0.006 0*	0.043 0±0.003 0
3	0.114 7±0.010 4*	0.044 5±0.001 9
5	0.094 2±0.002 9*	0.044 1±0.002 5
7	0.084 0±0.004 4*	0.045 2±0.002 6
10	0.064 2±0.003 1*	0.043 1±0.002 2
14	0.061 4±0.001 2*	0.042 3±0.001 2
28	0.045 9±0.002 6#	0.045 5±0.001 6

\*:实验组与对照组比较,P<0.05;#:实验组与对照组比较,P>0.05。

表 2 不同时间实验组和对照组 BSP 组化染色平均光密度值(̄x±s)

时间(d)	实验组	对照组
0	0.092 6±0.001 8*	0.043 1±0.001 5
1	0.103 0±0.003 8*	0.046 0±0.002 9
3	0.157 2±0.005 6*	0.043 9±0.003 5
5	0.101 7±0.001 9*	0.044 7±0.003 6
7	0.081 9±0.001 9*	0.043 2±0.001 6
10	0.073 4±0.003 6*	0.044 0±0.002 0
14	0.065 5±0.002 5*	0.044 7±0.002 9
28	0.044 2±0.001 5#	0.044 3±0.003 6

\*:实验组与对照组比较,P<0.05;#:实验组与对照组比较,P>0.05。

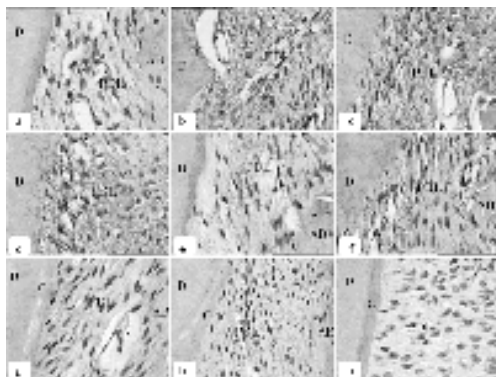


a,b,c,d,e,f,g,h,i 分别代表实验第 0,1,3,5,7,10,14,28 天和对照组(C:牙骨质,D:牙本质,AB:牙槽骨,PDL:牙周膜)。

图 2 BMP-2 在牙周组织中的表达(×400)

**2.2.2 BSP** 对照组:在牙周膜成纤维细胞、成骨细胞、成牙骨质细胞等的胞浆呈弱阳性表达,髓周前期牙本质层染色阳性,牙槽骨、根尖部细胞牙骨质区域少见阳性染色细胞。实验

组; BSP 表达定位于细胞浆和细胞膜, 深染的棕黄色微粒。棕黄色阳性细胞广泛分布于根尖部细胞牙骨质、牙周膜、根分叉区、牙本质牙骨质界、牙槽骨, 髓周前期牙本质层。根尖牙本质牙骨质界可见阳性染色, 染色强度于第 0 天开始升高, 第 3 天染色强度最深, 第 5 天开始下降, 直至第 28 天呈弱阳性表达, 见图 3。实验结果见表 2。



a,b,c,d,e,f,g,h,i 分别代表实验第 0,1,3,5,7,10,14,28 天和对照组(C:牙骨质,D:牙本质,AB:牙槽骨,PDL:牙周膜)。

图 3 BSP 在牙周组织中的表达( $\times 400$ )

### 3 讨 论

在接受正畸治疗的患者中牙根吸收的发生率为 3%~100%<sup>[3]</sup>,严重的牙根吸收将会影响牙齿的功能和使用时间。Owman-Moll 和 Kuroi<sup>[4]</sup>研究发现,矫治力去除之后 2 周和 6 周,分别有 38%和 82%的人类前磨牙牙根吸收发生修复。大鼠牙根吸收陷窝中既存在吸收性标记物,也存在有修复标记物<sup>[5]</sup>。Bosshardt<sup>[6]</sup>认为大鼠成牙骨质细胞活性很高,无细胞外源性纤维牙骨质可以很快开始修复大鼠牙根吸收陷窝。Brudvik 和 Rygh<sup>[7]</sup>认为当正畸力减小透明样变消失后,吸收过程便停止了,牙骨质修复开始。也有研究认为,牙根修复的全面启动,是在终止矫治力后<sup>[8]</sup>。

牙齿受力向近中移动时,牙根近中面受压发生骨质吸收,远中面受牵引发生骨质修复,而 BMP 在成骨过程中表达明显。本实验观察到 BMP-2、BSP 在正畸加力装置拆除后表达增强,可能与 BMP-2 和 BSP 诱导牙周膜的间充质细胞分化,分化为成牙骨质细胞,形成新的牙骨质及牙周纤维,促进牙周组织的修复有关。

BMP-2 能引起细胞的增殖、分化和凋亡,参与骨和软骨的形成、改建和修复,它通过提高碱性磷酸酶的活性,提高骨钙素和胶原蛋白的表达,刺激未分化间充质细胞向成骨细胞及软骨细胞定向分化,提高成骨细胞的成骨活性,而对已经分化成熟的骨细胞和软骨细胞无作用。Yamashiro 等<sup>[9]</sup>发现 BMPs 是由牙滤泡细胞产生的,因此认为 BMPs 在牙根形成过程中起调节成骨细胞分化的作用。本实验的研究结果表明,BMP-2 自矫治器拆除后开始升高,牙根吸收后的修复过程开始,说明牙根表面牙骨质有较强的再生能力,作者推测 BMP-2 参与调节了成骨细胞和成牙骨质细胞的分化过程。

Ganss 等<sup>[10]</sup>认为 BSP 是牙骨质形成的关键。也有研究发现 BSP 在成熟的骨形成细胞中表达,因此是骨分化的晚期标志<sup>[11]</sup>。Hosoya 等<sup>[12]</sup>研究结果显示,在成骨细胞和成牙骨质细胞以及新形成的牙槽骨和牙骨质中均可见 BSP 的阳性表达,

并且认为 BSP 是 BMP 的下游蛋白质。而 Kawaguchi 等<sup>[13]</sup>认为 BSP 同骨桥蛋白(OPN)一样是暴露的牙根表面牙骨质修复过程中最初出现的,在新形成的牙骨质与原有的牙骨质之间有一层由 BSP 构成的有机基质。本研究发现,BSP 自拆除装置后第 0 天开始检出阳性,说明自矫治器拆除后,牙根吸收的修复过程就开始全面启动了,同 Kawaguchi 等<sup>[13]</sup>的结果一致。本研究结果为作者临床上所观察到的在矫治器拆除后,已经发生牙根吸收的牙根可出现不完全修复提供了理论依据。

本研究结果表明:BMP-2、BSP 的浓度在大鼠正畸牙矫治力终止后不同时间段牙周组织中选择性高强度表达,提示在正畸矫治力终止后牙根吸收修复系统即刻启动,复杂的修复过程开始;BMP-2 是高效能的骨诱导因子,BSP 对成牙骨质细胞的分化也有重要意义,推测这两种物质通过自分泌和(或)旁分泌机制参与了牙根修复的成骨过程,诱导了间充质细胞分化,加速了成骨细胞活动,促进骨修复和形成,调节牙槽骨的改建过程,在牙根吸收后的早期修复活动中发挥了重要的作用。两者可能在牙骨质的矿化过程中作用重大,表达越多,说明牙骨质矿化作用越强,但是两者表达的峰值出现有一定的差异,BMP-2 在第 1 天出现峰值,而 BSP 在第 3 天才出现峰值,作者推测 BSP 的分化可能与 BMP-2 的表达有关,那么 BMP-2 是否对 BSP 一定有诱导作用仍需要进一步进行验证。

### 参考文献:

- [1] Chen D, Harris MA, Rossini G, et al. Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) enhances BMP-3, BMP-4, and bone cell differentiation marker gene expression during the induction of mineralized bone matrix formation in cultures of fetal rat calvarial osteoblasts[J]. *Calcif Tissue Int*, 1997, 60(3):283.
- [2] Chen J, Shapiro HS, Sodek J. Development expression of bone sialoprotein mRNA in rat mineralized connective tissues[J]. *J Bone Mineral Res*, 1992, 7(8):987.
- [3] Brudvik P, Rygh P. The repair of orthodontic root resorption; an ultrastructural study[J]. *Eur J Orthod*, 1995, 17(1):189.
- [4] Owman-Moll P, Kuroi J. The early reparative process of orthodontically induced root resorption in adolescents—location and type of tissue[J]. *Eur J Orthod*, 1998, 20(6):727.
- [5] Kimura R, Anan H, Matsumoto A. Dental root resorption and repair; histology during physiological drift of rat molars[J]. *J Periodontol Res*, 2003, 38(5):525.
- [6] Bosshardt DD. Are cementoblasts a subpopulation of osteoblasts or a unique phenotype[J]. *J Dental Res*, 2005, 84(5):390.
- [7] Brudvik P, Rygh P. Transition of orthodontic root resorption-repair sequence[J]. *Eur J Orthodont*, 1995, 17:177.
- [8] Harris DA, Jones AS, Darendeliler MA. Physical properties of root cementum: Part 8. Volumetric analysis of root resorption craters after application of controlled intrusive light and heavy orthodontic forces; A(下转第 1218 页)

表 2 所示。3 种载荷下 1.0 mm 高度的种植体、基桩应力值均较 0.7 mm 和 1.2 mm 高度小,而中央螺钉应力值最大。

表 2 不同 Spline 高度的模型各部件最大 Von Mises 应力值 (MPa)

Spline 种植体模型	Bolt=405 N			Vertical=200 N			Oblique=100 N		
	I	A	S	I	A	S	I	A	S
0.7 mm	123	142	338	160	165	353	332	214	462
1.0 mm	88	112	341	115	159	396	320	210	519
1.2 mm	114	149	320	236	163	352	407	213	458

I:种植体;A:基桩;S:中央螺钉。

不同连接高度的中央螺钉最大应力值均位于螺钉头部与螺杆交接处,种植体最大应力值均位于 Spline 根部(图 2)。

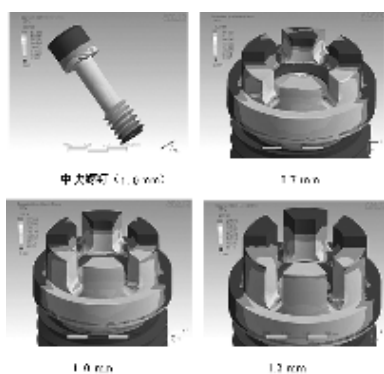


图 2 斜向载荷下应力分布图

### 3 讨 论

对于常见的外六边连接, Branmark 系统最初连接高度为 0.7 mm,但随后的研究发现外六边高度需要 1.2 mm 才能很好地达到抗旋转和抗侧向力的作用<sup>[5]</sup>,但未对外六边高度与应力分布的关系进行研究。Spline 连接属于外连接方式,其突起高度为 1.0 mm,本实验参考目前其他系统的外六边的连接高度,设计了 0.7、1.0、1.2 mm 3 种高度的 Spline 种植体,运用三维有限元方法进行应力分析以了解 Spline 突的内部应力分布规律以及 Spline 突高度与应力分布之间的关系。

本实验中,不同连接高度的中央螺钉最大应力值均位于螺钉头部与螺杆交接处,该处是螺钉疲劳失败通常发生的一个部位<sup>[6-7]</sup>,主要是因为两部分之间曲率半径和直径变化所产生的应力集中所导致。不同连接高度的 Spline 种植体在不同载荷

下的最大应力值都位于突起根部,但应力值远远小于材料的屈服强度,关于 Spline 突起是否会折断以及在何种情况下会出现这种情况,尚需要进一步实验。

从实验结果还可以看出,不同的连接高度对 Spline 种植体-基桩界面的应力分布有一定影响:不同载荷下 1.0 mm 高度的种植体、基桩应力值最小,而中央螺钉应力值最大。由于中央螺钉与种植体、基桩应力值差别最大,可以更好地发挥弱连接<sup>[8-9]</sup>的作用,即中央螺钉在其他部件破坏之前发生塑性形变或折断,从而达到保护种植体的目的,同时 1.0 mm 的 Spline 突高度较好地达到了抗旋转和抗侧向力的作用。所以本研究认为 1.0 mm 的 Spline 突高度是较为合理的连接高度。

### 参考文献:

- [1] Binon PP. The Spline implant: design, engineering and evaluation[J]. *Prosthodont*, 1996, 9: 416.
- [2] 雷涛,张纲,有限元法在颌骨生物力学研究中的应用研究进展[J]. *重庆医学*, 2009, 38(3): 350.
- [3] Alkan I, Serthez A, Ekici B. Influence of occlusal forces on stress distribution in preloaded dental implant screws[J]. *Prosthet Dent*, 2004, 91(4): 319.
- [4] 卜炎. 螺纹连接设计与计算[M]. 北京: 高等教育出版社, 1995.
- [5] Ohnell L, Hersh J, Ericsson L. Single tooth rehabilitation using osseointegration: a modified surgical and prosthodontic approach[J]. *Quintessence Int*, 1988, 19: 871.
- [6] Patterson EA, Johns RS. Theoretical analysis of the fatigue life of fixture screws in osseointegrated dental implant[J]. *Oral Maxillofac Implants*, 1992, 7(1): 26.
- [7] 孔亮,刘宝林,胡开进,等. 螺纹种植体螺距的优化设计和应力分析[J]. *华西口腔医学杂志*, 2006, 24(6): 509.
- [8] Binon PP, Suter F, Beaty K, et al. The role of screws in implant systems[J]. *Oral Maxillofac Implants*, 1994, 9 (Supply): 48.
- [9] 杜焱,叶平,吴润发. 三维有限元分析过盈配合对种植体骨界面应力分布的影响[J]. *中国口腔种植学杂志*, 2008, 13(1): 22.

(收稿日期: 2009-12-25)

(上接第 1216 页)

- microcomputed tomography scan study[J]. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 2006, 130(5): 639.
- [9] Yamashiro T, Tummers M, Thesleff I. Expression of bone morphogenetic proteins and Msx genes during root formation[J]. *J Dent Res*, 2003, 82: 172.
  - [10] Ganss B, Kim RH, Sodek J. Bone sialoprotein[J]. *Crit Rev Oral Biol Med*, 1999, 10: 79.
  - [11] Zhang Q, Domenicucci C, Goldberg HA. Characterization of fetal porcine bone sialoproteins, secreted phosphopro-

tein, bone sialoprotein, and a 23-kDa glycoprotein[J]. *J Biol Chem*, 1990, 265(13): 7583.

- [12] Hosoya A, Ninomiya T, Hiraga T. Alveolar bone regeneration of subcutaneously transplanted rat molar[J]. *Bone*, 2008, 42(2): 350.
- [13] Kawaguchi H, Ogawa T, Kurihara H. Immunodetection of noncollagenous matrix proteins during periodontal tissue regeneration[J]. *J Periodont Res*, 2001, 36(4): 205.

(收稿日期: 2009-12-25)