

[文章编号] 1000-1182(2008)03-0327-04

大鼠动情周期不同阶段正畸牙移动速度 差异机制的研究

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 探讨正畸牙移动对雌激素和胰岛素样生长因子(IGF)表达的影响,从体内实验角度阐明月经周期和应力对局部骨改建的影响机制。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,采用放射免疫、免疫组织化学和原位杂交等方法检测雌性大鼠动情周期不同阶段血清雌激素和牙周组织中的雌激素及IGF mRNA的表达变化。采用SPSS 11.0软件包对数据进行统计分析。结果 正畸牙移动使处于动情周期不同阶段的雌性大鼠血清和牙周组织中的雌激素及牙周组织中的IGF mRNA表达增加,其中血清、牙周组织中的雌激素和IGF-1的表达均表现为在动情期最低,动情前期最高;而IGF-2的表达在动情周期没有明显规律。结论 牙周组织中的雌激素及IGF参与了正畸牙移动引起的牙周组织改建,牙齿移动速度与月经周期密切相关。

[关键词] 牙移动; 动情周期; 雌激素; 胰岛素样生长因子

[中图分类号] R783.5 **[文献标识码]** A

A bio-mechanism study of differential orthodontic tooth moving speed during the estrous cycle 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 The purpose of this article was to investigate the changes of the estrogen and insulinlike growth factors(IGF) level induced by orthodontic tooth movements in order to elucidate the bio-mechanism of orthodontic treatments during the estrous cycle. Methods A Wistar rat experimental model was established to apply orthodontic activation during different stages of estrous. The serum and periodontal tissue estradiol level were determined by radioimmunoassay and immunohistochemistry. In situ hybridization was also used to detect the variation of the IGF mRNA expression in the periodontal tissues. The data of each group was analyzed with SPSS 11.0 software package. Results Both serum and periodontal estradiol level were increased by orthodontic activation during various stages of the estrous. IGF mRNA expression were also enhanced with the same trend. The estradiol and IGF-1 level showed in a similar pattern during the estrous cycle and the rhythm was not changed by the orthodontic activation. There was no rhythm of IGF-2 expression found in the estrous cycle. Conclusion It was concluded that estrogen and IGF were involved in the remodeling activities induced by the orthodontic activation. The speed of the orthodontic tooth movements was closely related to the estrous cycle.

[Key words] tooth movements; estrous cycle; estrogen; insulinlike growth factors

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的正畸力影响,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,女性患者为

多,在月经周期中,雌激素含量呈节律性波动^[1],并伴随着相应的骨改建循环^[2]。Haruyama等^[3]实验证实,月经周期中的雌激素波动是通过骨吸收环节的调控来影响正畸牙移动的效果的,但月经周期和局部应力对牙周改建影响的确切机制尚不明了。

体外实验^[4]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,而胰岛素样生长因子(insulinlike growth factors, IGF)在这两种增殖效应中起着重要作用。IGF包含IGF-1和IGF-2

[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,现在北京大学从事博士后研究

[通讯作者] 陈扬熙, Tel: 028-85503477

两种类型,分布在血液循环和很多组织中,两者对于维持复杂器官的正常结构和功能都非常重要^[6]。骨组织是IGF的主要来源,在局部以自分泌/旁分泌形式调节骨内各种细胞的功能活动,但是IGF-¹和IGF-²发挥的作用不同。本研究通过建立大鼠动情周期正畸牙移动的实验模型,观察不同阶段正畸牙移动引起全身及牙周组织中雌激素和IGF的变化,为探讨女性月经生理周期状态下正畸治疗引起牙周改建的生物学机制提供实验依据。

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个月龄Wistar雌性大鼠120只(体重约300 g,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 采用King等^[7]提出的正畸牙移动方法,器械装置包括: 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。在力的作用下,左侧上颌第一磨牙近中向移动。

1.2 实验动物分组及处理

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。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)设为加力自身对侧对照组。

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,固定一个动情周期后,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 牙齿移动距离的测量

对于加力实验组,在实验结束时间点由同一个人用游标卡尺(精确度0.02 mm)测量加力组大鼠左侧上颌切牙远中邻面到同侧第一磨牙近中邻面间的距离,测量3次,取平均值。

1.4 大鼠血清及牙周组织中雌激素表达的测定

在大鼠处死前,取各组实验大鼠右心室血约

2 mL, 4 ℃ 3 000 r/min离心10 min,取上清液,采用放射免疫法测定大鼠血清中雌激素的表达,操作步骤按试剂盒说明书进行。

实验大鼠心脏灌注后取双侧上颌骨,常规制备组织切片。取材部位为上颌骨及牙齿矢状向切片,切片厚度4 μm,随后进行牙周组织中雌激素表达的免疫组织化学检测。材料如下:兔抗雌激素多克隆抗体(Chemicon公司,美国),免疫组化染色SP试剂盒(Zymed公司,美国)。实验步骤按说明书进行。设立乳腺导管癌上皮细胞为阳性对照,PBS代替一抗为阴性对照。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-pro plus 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。

1.5 大鼠牙周组织IGF mRNA表达的原位杂交检测

将制取的大鼠牙周组织切片经体积分数为4%多聚甲醛固定及0.5% H₂O₂/甲醇灭活内源性过氧化物酶后,进行IGF mRNA表达的原位杂交检测,操作步骤按原位杂交试剂盒(武汉博士德有限公司)使用说明进行。

探针为地高辛标记的多相寡核苷酸探针,IGF-¹探针序列为: 5 - CTTCTACCTGGCACTCTGCTTGCTCACCTT - 3 ; 5 - AAGGAAGTACACTTGAAGAACA-CAAGTAGA - 3 。IGF-²探针序列为: 5 - TGGCCTTCGCCTCGTGCTGCATTGCTGCTT - 3 ; 5 - GCGTTCAGGGAGGCCAAACGTCACCGTCCC - 3 。最后以二氨基联苯胺显色,苏木素复染。设立人乳腺癌标本为阳性对照及预杂交液代替探针为阴性对照。

Image-pro plus 4.01图像分析软件对各实验组牙周张力侧的阳性信号(平均光密度值)进行半定量测定,以交互方式测定3个不同区域,取平均值。

1.6 统计分析

单因素方差分析法比较动情周期同一阶段加力组与对照组差异,用Student-Newman-Keuls(S-N-K)法进行同一组内动情周期不同阶段间的两两比较。

2 结果

2.1 牙齿移动距离的测量

在动情周期的不同阶段加力实验组的牙移动总量为:动情前期(1.79 ± 0.03) mm;动情期(2.10 ± 0.14) mm;动情后期(1.94 ± 0.04) mm;动情间期(1.89 ± 0.06) mm。单因素方差分析及S-N-K两两比较结果显示,加力实验组引起的牙齿移动量与各对照组相比,两者差异有统计学意义(P<0.05)。其中在动情前期加力引起牙移动量最小,在动情期加力

引起牙移动量最大($P < 0.05$)；动情后期和间期加力牙移动量相当($P > 0.05$)，介于前两者之间。

2.2 大鼠动情周期不同阶段血清及牙周组织中雌二醇的质量浓度

2.2.1 血清雌二醇质量浓度 大鼠动情周期不同阶段血清雌二醇质量浓度见表1，单因素方差分析显示，各加力实验组血清雌二醇质量浓度随动情周期变化，在动情前期最高($P < 0.05$)，动情期最低($P < 0.05$)；无论选择动情周期的任一个阶段进行加力处理，血清雌二醇质量浓度都会升高($P < 0.01$)。

表 1 实验各组大鼠血清雌二醇质量浓度 $\mu\text{g/mL}$, $\bar{x} \pm s$

Tab 1 The rat serum estradiol level of test and control group $\mu\text{g/mL}$, $\bar{x} \pm s$

组别	雌二醇质量浓度			
	动情前期	动情期	动情后期	动情间期
A	55.55 \pm 2.44	32.16 \pm 1.89	36.35 \pm 0.79	36.75 \pm 0.92
B	55.84 \pm 2.53	32.38 \pm 2.11	36.62 \pm 0.62	36.79 \pm 0.86
D	63.24 \pm 0.93	32.53 \pm 0.45	38.18 \pm 0.76	39.90 \pm 0.64

注：A空白对照组；B假处理组；D加力实验组

2.2.2 牙周组织中雌二醇表达 实验各组大鼠牙周组织中雌二醇表达的平均光密度值见表2，经单因素方差分析和S-N-K两两检验结果显示，在动情周期不同阶段，所有加力实验组牙周组织中雌二醇的表达具有相似的规律：动情期最低，动情前期最高，动情后期和动情间期相当且介于前两者之间。无论选择动情周期任一阶段进行加力，大鼠牙周组织中雌二醇的表达均高于空白对照组、假处理组和加力自身对侧对照组($P < 0.05$)，其中在动情前期增高幅度最大，在动情期增高幅度最小。

表 2 实验各组大鼠牙周组织中雌二醇表达的平均光密度值 $\bar{x} \pm s$

Tab 2 Estradiol expression optical density value of periodontal tissues of test and control group $\bar{x} \pm s$

组别	雌二醇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	198.25 \pm 6.49	144.92 \pm 4.80	167.19 \pm 5.79	167.61 \pm 5.83
B	197.69 \pm 7.63	146.37 \pm 4.50	171.04 \pm 5.86	166.80 \pm 6.28
C	201.67 \pm 5.21	146.55 \pm 4.79	169.33 \pm 6.59	169.73 \pm 4.55
D	220.63 \pm 4.37	155.21 \pm 4.75	179.87 \pm 5.21	178.66 \pm 8.71

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

2.3 大鼠动情周期不同阶段牙周组织中IGF mRNA的表达

2.3.1 IGF- mRNA的表达 实验各组大鼠牙周组

织IGF- mRNA表达的平均光密度值见表3，单因素方差分析及S-N-K法两两比较结果显示，动情周期不同阶段牙周组织中IGF- mRNA的表达强度在动情期最低($P < 0.05$)，动情前期最高($P < 0.05$)，而动情后期和动情间期相当($P > 0.05$)，且介于前两者之间。动情周期任一阶段加力实验组与空白对照组、假处理组和加力自身对侧对照组相比，牙周组织中IGF- mRNA表达强度皆增高($P < 0.05$)。

表 3 实验各组大鼠牙周组织IGF- mRNA表达的平均光密度值 $\bar{x} \pm s$

Tab 3 Optical density value of IGF- mRNA expression of rat periodontal tissues of test and control group $\bar{x} \pm s$

组别	IGF- I 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 \pm 4.57	155.14 \pm 8.85	188.16 \pm 5.58	192.05 \pm 6.34
B	241.08 \pm 5.97	147.92 \pm 7.53	185.87 \pm 5.16	187.65 \pm 5.47
C	243.37 \pm 5.50	149.69 \pm 7.66	191.47 \pm 6.97	191.55 \pm 6.45
D	257.32 \pm 7.56	160.29 \pm 6.73	196.61 \pm 7.49	203.07 \pm 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

2.3.2 IGF- mRNA的表达 实验各组大鼠牙周组织IGF- mRNA表达的平均光密度值见表4，单因素方差分析及S-N-K法两两比较结果显示，在动情周期的不同阶段牙周组织IGF- mRNA表达强度差异没有统计学意义($P > 0.05$)，但加力实验组与空白对照组、假处理组和加力自身对侧对照组相比，动情周期任一阶段的牙周组织中IGF- mRNA表达强度均增高($P < 0.05$)。

表 4 实验各组大鼠牙周组织IGF- mRNA表达的平均光密度值 $\bar{x} \pm s$

Tab 4 Optical density value of IGF- mRNA expression of rat periodontal tissues of test and control group $\bar{x} \pm s$

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 \pm 5.57	204.33 \pm 6.10	199.99 \pm 2.25	200.72 \pm 1.25
B	202.99 \pm 8.86	204.90 \pm 8.68	200.77 \pm 7.05	200.20 \pm 9.49
C	207.69 \pm 8.49	207.01 \pm 11.05	200.23 \pm 11.51	207.68 \pm 10.01
D	275.13 \pm 10.89	272.87 \pm 9.37	272.40 \pm 10.88	275.52 \pm 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

正畸牙移动是牙周软组织和牙槽骨改建的结果，在改建过程中骨吸收和骨形成同时存在。

Haruyama等^[9]实验证实,在大鼠动情期加力引起的牙齿移动比动情前期加力引起的快。本实验验证了这一结果,提示女性正畸牙齿移动的速度与月经周期状态密切相关。

月经周期是女性的一种正常生理变化,受到下丘脑-垂体-性腺轴的有效调节。在月经周期中,血清中的雌激素主要来源于卵巢分泌和外周组织转化^[8],呈节律性波动,并伴随着相应的骨改建循环^[2]。正畸治疗所带来的疼痛、不适会使机体产生不同程度的应激反应。有研究^[9]表明,创伤后应激反应会降低下丘脑-垂体-性腺轴的活动,但本研究结果显示,在动情周期的任一阶段加力引起的局部牙周改建均增强了全身和局部雌激素的表达,提示局部正畸治疗不仅有局部雌激素的参与,而且还可能引起机体的全身反应,血液中雌激素升高对全身其他靶器官的作用还有待进一步研究。

对于雌激素和局部机械刺激引起骨组织改建的途径,诸多研究结果并不吻合。Damien等^[10]研究结果说明,牵张所致的成骨细胞增殖效应是通过IGF-途径而导致的,而雌激素则是通过IGF-途径导致的。但也有很多学者认为机械刺激也可以增加局部组织中IGF-的表达。本研究结果显示正畸加力使牙周组织中IGF- mRNA的表达强度增高,说明局部张力可以上调IGF- mRNA表达。不同的是,IGF-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与全身和牙周局部雌激素存在相同规律,动情前期最高,动情期最低。IGF- mRNA的表达强度没有显示随动情周期变化的规律,局部的机械刺激直接导致牙周组织中IGF- mRNA的表达增强,与Cheng等^[4]研究结果相近。这些结果说明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- 则更多的是对应力发生反应的一种局部生长因子。

[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- and estrogen through IGF- [J]. J Bone Miner Res, 1999, 14(10) :1742- 1750.
- [5] Yakar S, Pennisi P, Wu Y, et al. Clinical relevance of systemic and local IGF- [J]. Endocr Dev, 2005, 9 :11- 16.
- [6] Montes GS, Luque EH. Effects of ovarian steroids on vaginal smears in the rat[J]. Acta Anat, 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 Dentofac Orthop, 1991, 99(5) :456- 465.
- [8] Simpson ER. Sources of estrogen and their importance[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2003, 86(3/5) :225- 230.
- [9] Graef FG. Biological basis of posttraumatic stress disorder[J]. Rev Bras Psiquiatr, 2003, 25(Suppl 1) :21- 24.
- [10] Damien E, Price JS, Lanyon LE, et al. 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.

(本文编辑 汤亚玲)

《华西口腔医学杂志》被美国《剑桥科学文摘 自然科学》收录

美国《剑桥科学文摘》(CSA)于30多年前由美国剑桥科学文摘社创办,是近几年发展最快的、大型的、综合性最强的数据库。美国《剑桥科学文摘(自然科学)》为自然科学部分,共有40个分数据库或分文摘。这40个分文摘共收录全世界期刊44 625种,其中收录中国期刊368种。《华西口腔医学杂志》2007年被美国《剑桥科学文摘(自然科学)》中的钙与钙化组织文摘(calcium and calcified tissue abstracts)、生物技术与生物工程文摘(biotechnology and bioengineering abstracts)、生物科学(biological sciences)3个分文摘收录。

《华西口腔医学杂志》编辑部