

# 组织蛋白酶 K 抑制剂对正畸牙移动牙周组织改建的影响

黄鹂 周泽渊 王欣 宿晨曦 邹淑娟\*

(四川大学华西口腔医院正畸科 四川 成都 610041)

**[摘要]** 目的:探究组织蛋白酶 K 抑制剂对大鼠正畸牙移动阶段牙周组织改建的影响。方法:42 只 Wistar 雄性大鼠,建立正畸牙移动模型,在牙移动第 0 天时处死 6 只大鼠作为基线,其余随机分为实验组和对照组,分别给予同剂量的组织蛋白酶 K 抑制剂和生理盐水局部注射,牙移动后第 3、7、14 天处死,取上颌骨第一磨牙远中根周围的牙周组织,进行 HE 染色、组织蛋白酶 K 及 I 型胶原免疫组织化学染色。结果:组织蛋白酶 K 主要在压力区表达,实验组组织蛋白酶 K 的阳性表达少于对照组,第 7、14 天时的表达量差异性显著( $P < 0.05$ )。I 型胶原主要在张力区表达,实验组 I 型胶原的阳性表达多于对照组,第 7、14 天时的表达差异显著( $P < 0.05$ )。结论:组织蛋白酶 K 抑制剂影响正畸牙移动过程牙周组织的改建,可抑制牙周组织中组织蛋白酶 K 的表达,促进 I 型胶原的分泌。

**[关键词]** 正畸牙移动 组织蛋白酶 K 抑制剂 Cat-K COL I

**[中图分类号]** R783.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671—7651(2017)12—1250—04

**[doi]** 10.13701/j.cnki.kqxyj.2017.12.003

**Effect of Cathepsin K Inhibitor on Remodeling of Periodontium during Orthodontic Tooth Movement.** HUANG Li, ZHOU Ze-yuan, WANG Xin, SU Chen-xi, ZOU Shu-juan\*. Department of Orthodontics, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China.

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of cathepsin K inhibitor on remodeling of periodontium during orthodontic tooth movement. **Methods:** Forty-two Wistar rats were subjected orthodontic tooth movement for 3, 7 and 14 days. Six rats were sacrificed immediately as initial control, the rest of rats were randomly divided into ODN group received local injection every third day with ODN and control group with saline of the same dose. Samples were collected at the 14th day after tooth movement period. The results were assessed by HE and IHC of Cat-K and COL I. **Results:** Cat-K mainly expressed in the pressure area and the positive expression of ODN group was less than the control group. COL I mainly expressed in the tension area and the positive expression of ODN group was more than the control group. The IHC results of Cat-K and COL I both had statistical significant difference on the 7th and 14th day. **Conclusion:** The Cat-K inhibitor odanacatib played a role in remodeling during orthodontic tooth movement. It could inhibit the expression of Cat-K and promote the secretion of COL I.

**[Key words]** Orthodontic tooth movement Cathepsin K inhibitor Cat-K COL I

正畸牙移动的生物学基础是正畸力作用于牙周组织后,激活一系列相关的信号传导途径,引起牙周膜与牙槽骨的改建。组织蛋白酶 K (cathepsin K, Cat-K) 主要在破骨细胞中表达,除此之外还存在于骨吸收表面、细胞溶酶体内和胞转囊泡<sup>[1]</sup>,在骨骼正常的生理结构及功能起到重要作用,因此近年来成为备受关注的靶向蛋白酶,其抑制剂也成为治疗骨代谢疾病的研究目标<sup>[2]</sup>。I 型胶原 (collagen I,

COL I) 是牙周膜固有纤维的主要成分,在稳定牙—牙槽骨连接,承担咀嚼力中扮演着重要的角色<sup>[3]</sup>。Odanacatib (ODN) 是组织蛋白酶 K 抑制剂的代表性药物,其药效学不同于其它抑制骨吸收的药物,其特点是抑制骨吸收,但不影响骨形成。本研究通过在正畸牙移动大鼠右侧上颌第一磨牙近中腭侧黏骨膜下注射组织蛋白酶 K 抑制剂 ODN,探讨其对牙移动时牙周组织中 COL I 及 Cat-K 表达变化的影响,并初步探讨其作用机制。

## 1 材料与方法

1.1 实验主要器材及试剂 硬组织切片机 (Leica, 德国); 数码三目摄像显微摄像系统 (BA200 Digital, 麦克奥迪公司, 厦门); Image-Pro Plus 6.0 图像分

**基金项目** 国家自然科学基金 (编号:81470777)

**作者简介** 黄鹂 (1992~), 女, 重庆人, 硕士在读, 主要从事口腔正畸学研究工作。

\* 通讯作者 邹淑娟, 电话: (028)85501474

析系统(Media Cybernetics,美国);0.012 英寸正畸 NiTi 拉簧(有色金属公司,北京);0.20 mm 结扎丝(新亚齿科公司,杭州);测力计(unitek,深圳);Cat-K、COL I 兔多克隆抗体(abcam,英国)。

1.2 实验动物及分组 Wistar 大鼠 42 只,雄性,8 周龄,体重(220±10) g,由四川大学基础医学院实验动物中心提供。在大鼠左侧上颌磨牙和中切牙间使用光固化树脂粘接固定一段正畸镍钛拉簧,施加 40 g 力,见图 1。实验组从加力后零天起每隔 2 d 于大鼠右侧上颌第一磨牙近中腭侧黏骨膜下注射 ODN(Selleck 公司,美国),对照组给予相同容量生理盐水(普济医疗用品有限公司,成都),于实验第 3,7,14 天处死(n=6)。



图 1 牙移动装置  
Fig. 1 Tooth movement device

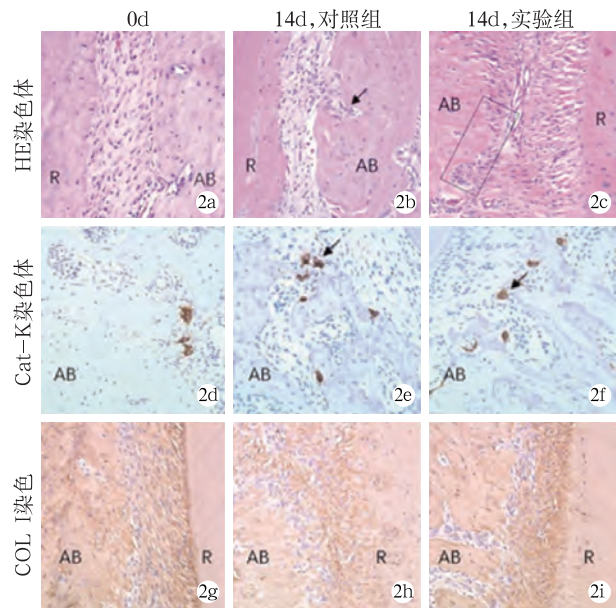
1.3 HE 染色观察牙周改建的组织学变化 动物处死后,取其上颌第一磨牙周围牙槽骨段,常规固定,脱水,包埋,沿牙槽骨组织矢状方向切片,切片厚度 5 μm,进行 HE 染色,光镜下 HE 染色观察组织结构变化,牙槽骨形态结构,牙周膜组织形态结构,细胞种类。

1.4 免疫组化法检测 Cat-K 和 COL I 石蜡切片梯度脱蜡至水,PBS 洗冲洗,分别用 EDTA 和柠檬酸盐抗原修复,冷却后 PBS 冲洗,双氧水避光 30 min,PBS 冲洗;滴加稀释的一抗 Cat-K(1:500),COL I(1:200)、磷酸盐缓冲液(PBS)做阴性对照,4 °C 过夜,PBS 冲洗;滴加生物素化山羊抗兔 IgG 二抗,37 °C 30 min,PBS 冲洗;滴加辣根过氧化酶标记链霉素卵蛋白试剂 30 min(37 °C),PBS 冲洗;使用 DAB 显色试剂盒,苏木素轻度复染,脱水,透明,中性树脂封片。

1.5 图像分析与统计学处理 组织观察及统计区域均为第一磨牙远中颊根近根尖 1/2。免疫组织化学结果采用 BA200Digital 数码三目显微摄像系统对切片进行图像采集,随机选取 3 个区域 400 倍采集图像。染色结果采用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析系统测定所采集全部图像的平均光密度值(mean optical density,MOD)。应用 SPSS17.0 统计分析软件对数据进行 t 检验,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,P < 0.05 为有显著性差异。

2 结果

2.1 HE 染色观察结果 第 3 天时,实验组和对照组均可见压力区局部牙周韧带玻璃样变,破骨细胞形成,但未见有骨吸收。第 7 天时,实验组和对照组破骨细胞数量明显增多,可见骨吸收。第 14 天时,实验组及对照组压力区牙周膜间隙狭窄,胶原纤维排列紊乱,牙槽骨呈蚕食状的吸收陷窝。实验组破骨细胞、破骨细胞陷窝数量,骨吸收量少于对照组。拉力区牙周膜宽度增加,对照组拉力区牙周膜宽度大于实验组,可见新骨沉积,骨面覆盖一层呈淡红色的类骨质,靠近类骨质边缘的牙周膜中见排列整齐的一层柱状成骨样细胞,见图 2。



2a~2c:苏木精-伊红染色;2d~2f:免疫组织化学染色检测 Cat-K;2g~2i:免疫组织化学染色检测 COL I。R:牙根,AB:牙槽骨(×400),图 2b 黑色箭头示吸收陷窝,图 2c 方框内示可观察到的成骨样细胞。图 2e、2f 黑色箭头示破骨细胞

图 2 观察区域的组织染色

Fig. 2 Tissue staining of the observed area

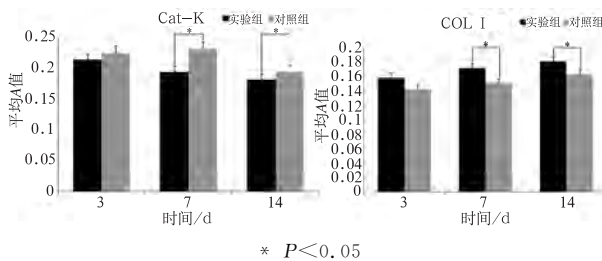


图 3 不同时间点 Cat-K 在 ODN 组和对照组的平均光密度值  
Fig. 3 MOD of Cat-K in ODN group and the control group at different time points

图 4 不同时间点 COL I 在 ODN 组和对照组的平均光密度值  
Fig. 4 MOD of COL I in ODN group and control group at different time points

2.2 牙周膜中 Cat-K 的表达,见表 1、图 2、图 3  
Cat-K 主要表达在细胞浆或间质等。阳性染色为浅黄色或棕黄色,阴性表达为蓝色,底色为白色。第 3 天时,实验组和对对照组压力区的 Cat-K 阳性表达都增加,第 7 天时实验组的有所表达减少,对照组的表达继续增加,第 14 天时,两组 Cat-K 的表达都减少,第 7、14 天时两组有显著性差异( $P < 0.05$ )。在整个牙移动过程中,实验组与对对照组张力区 Cat-K 的阳性表达少于压力区。

表 1 不同时间点 Cat-K 在 ODN 组和对对照组的平均光密度值

分组	0 d	3 d	7 d	14 d
ODN 组		0.212±0.004	0.193±0.006*	0.181±0.027*
对照组	0.187±0.199	0.223±0.014	0.230±0.018	0.193±0.024

注: \*  $P < 0.05$

表 2 不同时间点 COL I 在 ODN 组和对对照组的平均光密度值

分组	0 d	3 d	7 d	14 d
ODN 组		0.158±0.006	0.170±0.008*	0.180±0.010*
对照组	0.181±0.010	0.141±0.002	0.150±0.010	0.162±0.005

注: \*  $P < 0.05$

### 3 讨论

正畸牙移动的本质是牙周组织中破骨细胞和成骨细胞共同参与的骨改建,即:压力侧牙槽骨发生吸收,张力侧形成新骨<sup>[4]</sup>。施加适宜的正畸力之后,压力区的牙周组织破骨活动增强,牙周组织改建活跃<sup>[5]</sup>。破骨细胞参与的骨吸收包括骨无机成分的去矿化和骨有机成分的降解。吸收陷窝是破骨细胞紧密贴附在骨骼表面上形成的一个封闭微环境<sup>[6]</sup>,激活的破骨细胞在这个微环境中几乎特异地表达成熟的组织蛋白酶 K<sup>[7]</sup>,能有效地降解骨细胞外基质,在破骨细胞源性骨吸收中起决定性作用<sup>[8]</sup>。

组织蛋白酶 K 主要表达在破骨细胞中,另有研究表明组织蛋白酶 K 也存在于成纤维细胞,在成纤维细胞降解胶原过程中也起重要作用<sup>[9]</sup>。组织蛋白酶 K 在 pH 值约为 6 的酸性环境中可降解 I 型胶原蛋白,破坏三螺旋结构和端态结构,产生大小约 70~80 ku 的多肽片段<sup>[10]</sup>。本研究中,加力 0 d, Cat-K 在在骨基质、纤维基质及成纤维细胞中呈阳性表达;加力 3 d,实验组和对对照组 Cat-K 阳性表达的破骨细胞在压力侧的牙槽骨吸收部位开始集中。以往有研究表明:在正畸牙移动的牙槽骨改建过程中,成纤维细胞形成分泌的 Cat-K 可能作用于牙周韧带的胶原重建,而破骨细胞形成分泌的 Cat-K 则在降解胶

2.3 牙周膜中 COL I 的表达,见表 2、图 2、图 4  
COL I 蛋白主要表达在成骨细胞胞浆和类骨质中,阳性染色为棕黄色,在骨细胞胞浆中亦有少量表达。实验组和对对照组压力区 COL I 阳性表达较少,染色不均匀,随时间呈减少趋势。实验组和对对照组张力区 COL I 阳性表达在第 3 天时稍有减少,第 7、14 天时,实验组和对对照组 COL I 的阳性表达都增多,两组之间有显著性差异( $P < 0.05$ )。

原纤维中发挥作用<sup>[11]</sup>。本实验中,实验组 Cat-K 阳性表达在第 3 天时达到峰值后逐渐下降,对照组在第 7 天时达到峰值,两组在第 14 天时阳性表达有所下降。在整个正畸牙移动过程中,实验组比对照组阳性的表达少且在第 7、14 天时两组有显著性差异,这说明 ODN 能够有效抑制牙槽骨改建过程中破骨细胞中 Cat-K 的表达,与组织学上观察到的破骨细胞的表达规律一致。

I 型胶原蛋白是主要的骨结构蛋白,占骨基质有机成分的 95%,通过其受体整合素  $\alpha 2\beta 1$  对成骨细胞发挥促分化和促细胞间的粘附作用使其在成骨细胞的发育、分化中起重要作用,增强其成骨的能力<sup>[12]</sup>。本实验中,实验组和对对照组中拉力侧 COL I 的阳性表达第 3 天时较加力 0 d 有所减少,但随着时间推移而逐渐增多。I 型胶原蛋白的含量在加力的初期降低,可能是由于外力的刺激作用于胶原,促进了胶原的吞噬和降解,此后由于修复过程的开始,牙周膜改建的逐渐完成,I 型胶原蛋白的含量又逐渐增加。整个实验过程中,实验组比对照组的阳性表达相对较多且两组在第 7、14 天有显著性差异,提示着 ODN 具有促进成骨细胞分泌 COL I,减少胶原蛋白丢失的作用。

ODN 为组织蛋白酶 K 的特异性抑制剂<sup>[13]</sup>,作

用特点为诱导破骨细胞产生浅表陷窝,导致吸收面积减少,从而使骨吸收减少;另一方面,还使组织蛋白酶 K、抗酒石酸酸性磷酸酶及分解的基质蛋白蓄积细胞内囊泡,阻碍囊泡的正常转运,进一步抑制骨吸收。值得注意的是,不同于其他药物,ODN 可以在不影响破骨细胞的活性及存活状态下抑制骨的吸收<sup>[14]</sup>,同时血清中骨形成标志物—TRAP5b 的水平依然保持恒定<sup>[15]</sup>。本研究显示:局部注射组织蛋白酶 K 抑制剂 ODN 可影响正畸牙移动时牙周组织中牙槽骨的改建,导致压力区 Cat-K 阳性表达减少,拉力区 COL I 阳性表达增多,其作用机制可能是 ODN 上调了成骨细胞中 I 型胶原蛋白的分泌,下调了破骨细胞中组织蛋白酶 K 的表达,抑制骨基质中 I 型胶原的降解活动。

### 参考文献

- [1] Ng KW. Potential role of odanacatib in the treatment of osteoporosis [J]. *Clin Interv Aging*, 2012, 7 : 235-247
- [2] Pennypacker B, Shea M, Liu Q, et al. Bone density, strength, and formation in adult cathepsin K (-/-) mice [J]. *Bone*, 2009, 44(2) : 199-207
- [3] Ryan Me, Golub LM. Modulation of matrix metalloproteinase activities in periodontitis as a treatment strategy [J]. *Periodontol*, 2000, 24(2) : 226-238
- [4] Chen Y, Wang XX, Zhao BJ, et al. Effects of icariin on orthodontic tooth movement in rats [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(6) : 8608-8616
- [5] 王莹,王兰珠,韩博,等. 正畸力作用下压力侧 Wnt10b、RANKL 在牙周组织中的表达 [J]. *口腔医学研究*, 2016, 32(3) : 257-260
- [6] Boggild MK, Gajic-Veljanoski O, McDonald-Blumer H,

et al. Odanacatib for the treatment of osteoporosis [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2015, 16(11) : 1717-1726

- [7] Costa AG, Cusano NE, Silva BC. Cathepsin K: its skeletal actions and role as a therapeutic target in osteoporosis [J]. *J Biol Chem*, 2013, 394(9) : 1163-1179
- [8] Wilson SR, Peters C, Saftig P, et al. Cathepsin K activity-dependent regulation of osteoclast actin ring formation and bone resorption [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(4) : 2584-92
- [9] Wei XX, Chu JP, Zou YZ, et al. Effect of odanacatib on root resorption and alveolar bone metabolism during orthodontic tooth movement [J]. *Genet Mol Res*, 2015, 14(4) : 17972-17981
- [10] Luckey M, Cauley JA. osteoclast biology [J]. *Osteoporosis*, 2013, 8(1) : 149-160
- [11] 王威,王邦康,刘郁. 正畸牙移动压力侧牙槽骨中 cathepsinK、RANKL 和 OPG mRNA 及蛋白的表达 [J]. *北京口腔医学*, 2013, 21(6) : 309-313
- [12] 朱志刚,郭向阳,张秀珍. 尼尔雌醇对去卵巢大鼠骨组织中 I 型胶原代谢及组织蛋白酶 K 表达的影响 [J]. *中原医刊*, 2006, (24) : 30-32
- [13] Hao L, Chen W, McConnell M, et al. A small molecule, odanacatib, inhibits inflammation and bone loss caused by endodontic disease [J]. *Infect Immun*, 2015, 83(4) : 1235-1245
- [14] Leung P, Pickarski M, Zhuo Y, et al. The effect of the cathepsin K inhibitor odanacatib on osteoclastic bone resorption and vesicular trafficking [J]. *Bone*, 2011, 49(4) : 623-635
- [15] Halleen JM, Tiitinen SL, Ylipahkala H, et al. Tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRACP 5b) as a marker of bone resorption [J]. *Clin Lab*, 2006, 52(9-10) : 499-509

[收稿日期:2017-06-27]

(本文编辑 汪喻忠)

## · 告读作者 ·

《口腔医学研究》从 2016 年 1 期开始,为每篇刊出文章标注中文 DOI 号。

DOI 是 Digital Object Identifier 的英文缩写,是国际通用的数字对象标识符。它被誉为“互联网上的条形码”,是互联网数字资源的身份证及唯一编码。同时 DOI 系统是一套完整的国际服务体系,提供 DOI 的注册、解析及增值服务。

DOI 能够唯一性地标识一个单独的数字资源,并且可以保证在网络上永久链接。比如一个在线的电子文档,关于该电子文档的元数据存储在 DOI 服务系统。在其元数据中包括一个与它的 DOI 对应的 URL (Uniform Resource Locator),通过 URL 可以在网络上找到该电子文档。通过 DOI 系统,用户点击 DOI 即可链接到该电子文档的 URL(此过程称为 DOI 解析)。URL 发生变化时,只需要在 DOI 系统中进行更新,就可以通过 DOI 永久链接到这篇电子文档了。