

牙槽骨微穿孔术促进大鼠正畸牙移动的机制研究

赵云鹤 李娇 雷浪* 李厚轩

(南京大学医学院附属口腔医院/南京市口腔医院正畸科,
南京大学医学院附属口腔医院中心实验室 江苏 南京 210008)

[摘要] 目的:研究牙槽骨微穿孔技术(micro-osteoperforation, MOP)对牙移动过程中牙周组织改建的影响及其机制。方法:以16只8周龄、无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级健康雌性SD大鼠为研究对象,在一侧上颌第一磨牙近中行MOP,对侧不行MOP作为对照;以上颌中切牙为支抗,30 g力牵引上颌第一磨牙近中移动。7 d后处死大鼠,micro-CT测量上颌第一磨牙牙齿移动距离和牙槽骨的骨密度及骨体积分数;行苏木精-伊红染色(hematoxylin-eosin staining, HE)和免疫组织化学染色分析大鼠牙周组织的改建。结果:MOP加速了正畸牙移动,MOP+正畸加力组上颌第一磨牙移动距离为(420.82±175.58) μm,明显高于单纯正畸加力组(224.87±85.64) μm;对第一磨牙牙根周围骨密度及骨体积分数的分析结果显示,MOP+正畸加力组低于正畸组;HE染色结果显示,正畸加力后,第一磨牙压力侧牙周膜压缩变窄,张力侧牙周膜增宽;免疫组织化学染色结果显示,MOP+正畸加力组牙周组织内白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)表达水平高于单纯正畸加力组。结论:牙槽骨MOP增强了牙周组织促炎细胞因子表达水平,促进了正畸牙移动速度。

[关键词] 微穿孔 正畸牙移动 细胞因子

[文献标识码] A **[文章编号]** 1671-7651(2018)09-0960-04

[doi] 10.13701/j.cnki.kqxyj.2018.09.010

Mechanism of Micro-osteoperforation-accelerated Orthodontic Tooth Movement in Rats. ZHAO Yun-he, LI Jiao, LEI Lang*, LI Hou-xuan. Department of Orthodontics, Nanjing Stomatological Hospital, Medical School of Nanjing University, Central Laboratory of Stomatology, Institute and Hospital of Stomatology, Nanjing University Medical School, Nanjing University, Nanjing 350002, China.

[Abstract] **Objective:** To study the effect and mechanism of alveolar bone micro-osteoperforation (MOP) technique on periodontal tissue remodeling during tooth movement. **Methods:** Sixteen female, eight-week-old SPF Sprague Dawley rats were included in the study. MOP was performed on one side but not on the other control side. Upper 1st molar was protracted by 30 g orthodontic force with incisors being anchorage teeth. After 7 days, animals were sacrificed and the micro-CT scanning was performed to measure the tooth movement distance and bone density as well as bone volume fraction around the maxillary first molar. HE staining and immunohistochemical staining were utilized to analyze the alveolar bone remodeling in the periodontal tissue. **Results:** Orthodontic tooth movement was accelerated after performing MOP (420.82±175.58) μm mesial movement in the MOP + orthodontic force group and (224.87±85.64) μm in orthodontic force alone group. In addition, a more decreased bone mineral density and bone volume/total volume was observed in the MOP + orthodontic force group. Narrow periodontal membrane was observed on the pressure side while wide periodontal membrane was found on the tension side. Moreover, increased IL-6 level was observed in the periodontal tissues of MOP + orthodontic force group. **Conclusion:** MOP enhances the expression of proinflammatory cytokine in periodontal tissues and promotes the orthodontic tooth movement.

[Key words] Micro-osteoperforation Orthodontic tooth movement Cytokine

基金项目 南京市医学科技发展项目(编号:YK15155、JQX15036)
作者简介 赵云鹤(1989~),女,山西人,硕士研究生,主要从事正畸临床及基础相关研究。

* 通讯作者 雷浪, E-mail:leilangdental@163.com

在传统的正畸矫治术中,牙齿移动的速度最多为每月1 mm,正畸疗程长达2年,因此部分患者对正畸治疗的疗程望而生畏。如何在对牙周膜、牙槽骨、牙根以及牙髓无不可逆性损伤的条件下达到较

快的牙移动速度,缩短正畸疗程,一直是国内外学者共同关注的热点^[1]。在机械力作用下,牙周组织内的血流发生变化,会伴随与炎症反应类似的生物学反应,出现典型的压力侧牙槽骨吸收和张力侧牙槽骨沉积的组织改建。多年来,学者们尝试了牙周组织局部或全身用药如前列腺素 E2 (prostaglandin E2, PGE2)、直流电、低能量激光、牙槽间隔手术/牙槽骨牵张成骨术、骨皮质切开术及压电式切开术等技术,试图加快正畸牙移动速度^[2]。以上手术方式在促进牙齿移动的同时,其侵入性会给患者术后带来较多不适。

为减少牙槽骨手术带来的创伤和不良反应, Alikhani 等^[3] 2013 年提出了牙槽骨微穿孔技术 (micro-osteoperforation, MOP), 该技术利用专用钻孔器械在牙槽骨上形成小孔, 临床研究结果显示其能加速人尖牙远中移动。本实验的目的在于通过利用大鼠正畸牙移动模型, 分析牙槽骨 MOP 对牙周组织改建的影响, 分析 MOP 促进正畸牙移动的机制, 为其应用于正畸治疗提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料 戊巴比妥钠 (Sigma 公司, 美国); 正畸粘剂 (3M Unitek 公司, 美国); 超弹镍钛拉簧 (American Orthodontics 公司, 美国); A1 正畸支抗钉 (亚太公司, 台湾); 白细胞介素 (interleukin, IL)-6 (Proteintec 公司, 中国); 二抗 (迈新公司, 中国); 二氨基联苯胺 (diaminobenzidine, DAB) 显色试剂盒 (博士德生物公司, 中国)。

1.2 实验动物及分组 16 只 8 周龄雌性 SD 大鼠, 体重 (180±20) g, 分为正畸加力组和不加力对照组 ($n=8$)。正畸加力组上颌放置矫治器后, 一侧行牙槽骨微穿孔后正畸加力, 对侧仅单纯正畸加力; 不加力对照组仅上颌放置正畸矫治器, 一侧行微穿孔术不正畸加力, 对侧仅放置正畸矫治器。

1.3 动物模型的建立 SD 大鼠腹腔注射含 2% 戊巴比妥钠生理盐水溶液 (60 mg/kg 体重) 麻醉。将大鼠放置于仰卧位, 在大鼠腭侧距离第一磨牙近中 1 mm 处, 牙槽嵴顶下方 2 mm 开始, 采用手柄 A1 不锈钢支抗钉 (直径 0.6 mm) 制备 1.5 mm 深度的微穿孔 3 个, 垂直向间隔 1 mm。为防止切牙结扎丝滑脱, 预先用金刚砂车针于切牙近远中及唇侧磨一固位沟, 用结扎丝结扎, 将 NiTi 拉簧 (American Orthodontic 公司, 美国) 用结扎丝固定于上颌第一磨牙与切牙之间, 施加牵引力 30 g, 并使用光固化树脂粘结固定前牙区结扎丝, 防止其滑脱 (图 1)。



图 1 大鼠正畸牙移动模型

Fig. 1 Rat model of orthodontic tooth movement.

1.4 标本采集 所有大鼠在 7 d 后断颈处死。将上颌骨完整取出, 4% 多聚甲醛固定 48 h。

1.5 micro-CT 扫描 将固定完成的上颌骨标本进行 micro-CT 扫描, 通过测量上颌第一磨牙之间牙冠远中轴面与第二磨牙牙冠近中轴面最凸点之间的距离评估上颌第一磨牙牙齿移动距离; 三维重建后对大鼠上颌第一磨牙牙根周围骨密度 (bone mineral density, BMD) 及骨体积分数 (bone volume fraction, BVF) 比较分析。

1.6 免疫组织化学染色 标本置于 10% 乙二胺四乙酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) 脱钙液中脱钙 8 周, 隔天更换脱钙液, 室温脱钙, 直至针尖可以轻易穿透牙齿。梯度乙醇脱水, 常规石蜡包埋, 沿上颌牙槽骨矢状面进行切片, 厚 4 μ m。标本经苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin staining, HE) 染色, 石蜡切片烘片后常规脱蜡, 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 冲洗, 苏木精复染 3 min, 流动清水冲洗 1 min, 置于 1% 盐酸乙醇分色, 流动清水冲洗 30 s 后返蓝 1 min, 伊红染色 3 min, 流动清水冲洗 1 min, 再行逐级脱水, 中性树脂胶封片。免疫组织化学染色中, 将石蜡切片常规脱蜡, 3% 过氧化氢溶液闭光 20 min, 蒸馏水洗涤 3 次, 微波法进行抗原修复, 冷却至室温。油性笔圈定区域后 PBS 冲洗 3 次, 小心擦干。每个标本加入 75 μ L IL-6 一抗 (1:400) 置于湿盒中 4 $^{\circ}$ C 静置过夜, 次日 PBS 冲洗 3 遍, 小心擦干后, 加入二抗孵育 30 min, PBS 冲洗, DAB 显色, 苏木精复染, 逐级乙醇脱水, 二甲苯液透明, 中性树脂胶封片, 观察。使用 Image-Pro Plus (IPP) 软件测量分析。

1.7 统计学分析 采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。采用 Levene's Test 方差齐性检验, 组间比较采用独立样本 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 牙移动距离 加力 7 d 后, 测量上颌第一磨牙

牙冠远中轴面最凸点与第二磨牙牙冠近中轴面最凸点之间的距离,作为第一磨牙牙移动距离。结果显示,微穿孔+正畸加力组大鼠上颌第一二磨牙之间移动距离为 $(420.82 \pm 175.58) \mu\text{m}$,明显高于单纯正畸加力组 $[(224.87 \pm 85.64) \mu\text{m}, P < 0.001]$,不加力的对照组距离为 $(19.50 \pm 13.58) \mu\text{m}$ 和MOP阳性对照组距离为 $(32.69 \pm 16.45) \mu\text{m}$,第一磨牙未见明显牙移动。

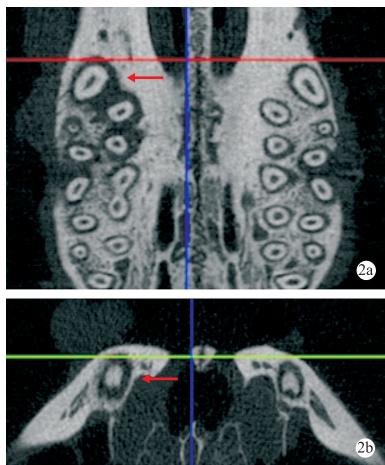
2.2 骨密度及骨体积 三维重建后,分析大鼠第一磨牙牙根周围的BMD及BVF,结果显示,MOP对照组与不加力对照组比较无明显改变,MOP+正畸加力组和单纯正畸组BMD及BVF降低,并且

表1 各组骨密度及骨体积参数比较

Table 1 Bone mineral density and bone volume parameters of different groups $\bar{x} \pm s$

组别	BMD/ $\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$	BV/TV/%
Blank	1.628 ± 0.023	99.29 ± 0.29
MOP	1.628 ± 0.066	99.31 ± 0.22
Force	1.432 ± 0.048	97.82 ± 0.32
MOP+Force	1.087 ± 0.060	88.73 ± 0.68

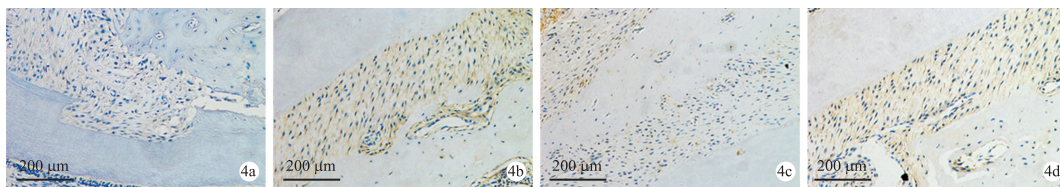
注:Blank:空白对照组;MOP:微穿孔阳性对照组;Force:单纯正畸加力组;MOP+Force:微穿孔+正畸加力组;BMD:骨密度;BV/TV:骨体积分数



2a:轴向;2b:冠状;红色箭头为MOP+Force侧

图2 第一磨牙牙根周围骨密度及骨体积分数的改变

Fig. 2 Bone mineral density and bone volume fraction around the root of 1st maxillary molars.



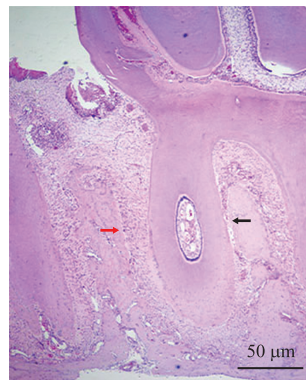
4a:空白对照组;4b:微穿孔阳性对照组;4c:单纯正畸加力组;4d:微穿孔+正畸加力组

图4 大鼠牙周组织IL-6的表达

Fig. 4 Expression of IL-6 in the rat periodontal tissues.

MOP+正畸加力组显著低于单纯正畸加力组 $(P < 0.001)$,见表1、图2。

2.3 HE染色及免疫组织化学染色分析 HE染色结果显示,上颌第一磨牙牙根近中侧牙周膜明显压缩变窄,而张力侧牙周膜增宽(图3)。IL-6染色结果示,MOP+正畸加力组、单纯正畸加力组及MOP阳性对照组牙周膜内均表达IL-6,与空白对照组比较差异有统计学意义 $(P < 0.05)$;MOP+正畸加力组牙周膜内IL-6表达量较单纯正畸加力组更明显 $(P < 0.05)$,见图4。



黑色箭头为压力侧,红色箭头为拉力侧

图3 大鼠正畸牙移动过程中的牙周组织改变

Fig. 3 Changes of periodontal tissues during orthodontic tooth movement.

3 讨论

随着成人正畸的病例数量的增加,如何提高正畸效率和缩短矫治疗程是正畸医生亟待解决的问题。采用高效、低摩擦的矫治器和矫治体系可以提高矫治效能,然而不能从根本上提高牙齿移动效率。众所周知,成人牙齿移动速度慢于生长期儿童,其原因是正畸牙移动是牙齿受力后的生物学反应,牙齿移动的快慢受生物学反应影响^[4]。因此,只有从生物学角度出发,才能从根本上提高牙齿移动的效能。

基于牙移动的生物学基础,学者们从生物学角度对提高牙齿移动速度进行了探索。牙周组织局部应用花生四烯酸的代谢产物,如PGE2和血栓素A2等,在促进牙移动的同时,会加重患者的疼痛反应,

并出现药物的不良反应;在骨皮质术提出的早期阶段,学者们认为骨皮质是牙齿移动的限制因素,这种方式的主要问题是需要手术翻瓣,手术的侵入性和创伤让医生和患者难以接受^[5,6];此后学者们对此做出了修改,提出了牙槽骨牵张成骨术以获得尖牙快速远中移动,或压电切开术(piezocision)以去除骨皮质,激活牙槽骨改建。Wilcko 等^[7]将这些手术带来的牙齿移动的加速现象称为局部加速现象(regional acceleration phenomenon),即手术后的炎症反应是促进牙移动的本质,而不是骨皮质减少。

细胞因子如肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素- 1β (interleukin- 1β , IL- 1β)和 IL-6 等在牙齿移动过程中发挥了重要作用。牙齿受力后,牙周膜和牙槽骨发生形变,牙周膜内血供发生改变,牙周组织和骨组织中的防御细胞如中性粒细胞、单核细胞感受到正畸加力传导的信息,分泌细胞因子,启动炎症反应过程,牙周膜成纤维细胞、骨细胞、成骨细胞和破骨细胞的生物学行为发生改变。基于此理论假设,为了减少传统的骨皮质切开术带来的不适,Alikhani 等在 2013 年提出了颌骨微穿孔技术,并应用于临床。该技术利用手柄在颌骨表面制备数个穿透骨皮质的微孔,提升了人尖牙远中移动过程中的牙齿移动速度。这种牙槽骨损伤产生的炎症信号和正畸矫治的力学信号产生叠加,牙槽骨改建效果发生累积效果。

本研究利用大鼠牙移动模型,观察 MOP 促进牙齿移动的机制,发现 1.5 mm 的牙槽骨微穿孔后 1 周,在没有加力的大鼠第一磨牙即出现了 IL-6 的阳性表达;正畸加力后,MOP+正畸加力组牙齿移动速度快于单纯正畸加力组,提示促炎细胞因子 IL-6 可能参与了 MOP 介导的促牙齿移动过程。IL-6 是一种可由单核吞噬细胞、成纤维细胞、上皮细胞等多种细胞合成分泌,具有趋化防御细胞到刺激信号局部的生物学作用,还可以促进细胞增殖和分化。研究显示 IL-6 调节炎症部位的免疫应答,它具有自分泌/旁分泌活性,促进破骨细胞的分化和刺激前破骨细胞骨吸收活性^[8]。因此,在本实验中,

局部 MOP 产生颌骨的无菌性炎症,促进牙槽骨内的细胞因子 IL-6 水平,诱发牙周组织内的牙周膜成纤维细胞、成骨细胞和破骨细胞的生物学活性,对正畸应力做出积极应答,从而加速牙移动。以往的研究通过骨皮质切开或第一磨牙颊侧、腭侧、近中侧大量打孔^[7]。与前面的实验不同,本实验仅于大鼠第一磨牙压力侧均匀打 3 个微孔即明显加速了第一磨牙近中移动。

综上所述,促炎细胞因子可能介导了 MOP 技术促进的正畸牙移动。该技术不需要牙周翻瓣手术,手术产生的无菌性炎症可以促进牙周组织的反应,从而对正畸矫治力产生积极反应。因此 MOP 技术有可能应用于临床过程,特别是成人牙周组织炎症反应不足的病例,但需要注意控制牙周健康。

参考文献

- [1] Hoffmann S, Papadopoulos N, Visel D, et al. Influence of piezotomy and osteoperforation of the alveolar process on the rate of orthodontic tooth movement: a systematic review [J]. J Orofac Orthop, 2017, 78(4): 301-311
- [2] Huang H, Williams RC, Kyrkanides S. Accelerated orthodontic tooth movement: molecular mechanisms [J]. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 2014, 146(5): 620-632
- [3] Alikhani M, Raptis M, Zoldan B, et al. Effect of micro-osteoperforations on the rate of tooth movement [J]. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 2013, 144(5): 639-648
- [4] 吴颖,彭国光,陈扬熙,等.微创骨皮质切开术加速成人正畸牙移动的临床研究[J].实用口腔医学杂志,2017,33(2): 239-243
- [5] 周玉玲,王旭,张栋梁.骨皮质切开术辅助大鼠正畸牙移动中 OPN mRNA、BSP mRNA、OCN mRNA 表达的研究[J].口腔医学研究,2015,31(2): 123-126
- [6] 朱绍跃,刘宗响,李晓明,等.骨皮质切开术通过促进成骨影响大鼠牙齿快速移动安全性的研究[J].口腔医学研究,2017,33(4): 371-374
- [7] Wilcko W, Wilcko MT. Accelerating tooth movement: the case for corticotomy-induced orthodontics [J]. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 2013, 144(1): 4-12
- [8] 钱雅婧,钟良军,米从波,等.正畸力作用下大鼠炎性牙周组织改建及白细胞介素 6 的表达[J].中华口腔医学研究杂志(电子版),2010,4(5): 447-455

[收稿日期:2018-03-08]

(本文编辑 关隽)