

• 其他研究 •

三七总皂苷在兔牙齿移动过程中对牙周组织中破骨细胞及 BMP-2 表达的影响

蒋星宇^{1,2} 张玉峰^{1,2} 杨璐¹ 孙晋虎¹ 黎婷^{1,2*}

(1. 徐州医科大学口腔医学院 江苏 徐州 221000;

2. 徐州医科大学附属第二医院口腔科 江苏 徐州 221000)

[摘要] **目的:**通过建立兔子牙移动的模型,研究三七总皂苷(panax notoginseng saponin, PNS)对正牙过程中牙槽骨改建及牙周组织中 BMP-2 表达的影响。**方法:**选取 32 只 3~6 月龄的新西兰白兔随机分成 PNS 组和生理盐水(normal saline, NS)组,通过肌肉注射血栓通[40 mg/kg·d⁻¹]和 NS。每组各 16 只,又分为 7、14、21、28 d 4 个亚组,分别于正畸牙移动 1 周、2 周、3 周、4 周 4 个时间点分别处死各组动物取材,使用苏木精-伊红(HE)染色观察牙周膜及牙槽骨的变化,抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色检测破骨细胞,免疫组织化学染色(immunohistochemical, IHC)检测骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2)的表达变化。**结果:**PNS 组破骨细胞数目在第 1 周达到高峰,显著高于 NS 组($P<0.05$),然后持续下降,至第 3 周时下降至 NS 组水平,无统计学差别。从第 1 周开始, PNS 组 BMP-2 的表达高于 NS 组($P<0.05$),在第 2 周达到高峰,显著高于对照组($P<0.05$),然后持续下降,第 3 周、第 4 周时 PNS 组与 NS 组相比无显著差异。**结论:**三七总皂苷能在给药初始时期使牙周组织中破骨细胞的数量得到提升,还能提高牙周组织中 BMP-2 抗体蛋白的表达量,提示 PNS 在正畸牙齿移动的骨组织改建过程中具有积极作用。

[关键词] 三七总皂苷 骨形态发生蛋白-2 牙齿移动 破骨细胞

[文献标志码] A **[文章编号]** 1671-7651(2018)04-0442-06

[doi] 10.13701/j.cnki.kqxyj.2018.04.024

Effects of Panaxnotoginseng Saponins on Osteoclasts and Expression of BMP-2 in Periodontal Tissues of Rabbits during Teeth Movement. JIANG Xing-yu^{1,2}, ZHANG Yu-feng^{1,2}, YANG Lu¹, SUN Jin-hu¹, LI Ting^{1,2}. 1. School of Stomatology, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221000, China; 2. Department of Stomatology, The Affiliated Second Hospital, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221000, China.

[Abstract] **Objectives:** To study the effect of panaxnotoginseng saponins (PNS) on the alveolar bone remodeling and the expression of BMP-2 in rabbit periodontal tissues during orthodontic teeth movement. **Methods:** Thirty-two 3-6-month-old male New Zealand white rabbits were casually divided into two groups: PNS group and control group, which were injected with xueshaungton and normal saline by intramuscular injection. Each group was divided into 7, 14, 21, and 28 days four subgroups, respectively. The rabbits in each group were sacrificed to obtain mandibular tooth specimens after 1, 2, 3, and 4 weeks. The changes of periodontal ligament and alveolar bone were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining was used to detect osteoclasts numbers. Immunohistochemical (IHC) staining was used to detect the expression of BMP-2 in periodontal tissues of the teeth. **Results:** The numbers of osteoclasts in the PNS group reached a peak at the 1st week, and then declined in the 2nd week. There was no significant difference between PNS group and NS group in the 3rd week. The expression of BMP-2 in PNS group was higher than that in NS group ($P<0.05$) in the 1st week, and reached the peak in the 2nd week. The expression of BMP-2 was continued to decline in the 3rd and 4th week, and there was no significant difference between PNS group and NS group. **Conclusion:** Panaxnot-

oginseng saponins can increase the number of osteoclasts in periodontal tissues and increase the expression of BMP-2 in periodontal tissues, which suggests that PNS has a positive effect on the alveolar bone remodeling during teeth movement.

基金项目 徐州市科技计划项目(编号:KC14SH089、KH17037)

作者简介 蒋星宇(1990~),男,安徽金寨人,硕士,医师,主要从事口腔科的临床治疗工作。

* **通讯作者** 黎婷, E-mail: 2492767182@qq.com

[Key words] Panaxnotoginseng saponins Bone morphogenetic protein-2 Movement of teeth Osteoclasts

牙齿正畸时经过牙槽骨的不停改建,实现牙齿在牙槽骨内移动。在正牙过程中如果能活化牙槽骨,加快牙槽骨的改建速度和过程,将有可能加快牙齿在牙槽骨内的移动速度,从而缩短整个牙齿的矫正医治进程,减少病人的痛苦和医疗费用。三七应用于治疗创伤及骨折已有数千年历史,主要成分是三七总皂苷。张磊等^[1]等研究发现 PNS 使血管内皮生长细胞数量增多,PNS 组胶原合成比较迅速,比对照组更早出现 Sharpey 纤维,进而加快腱骨愈合速度。杜汶希等^[2]发现 PNS 可以增加骨髓干细胞的增殖,在治疗骨愈合不良,骨质疏松和骨坏死方面有一定的效果,有益于骨折的愈合和恢复功能。骨形态发生蛋白-2 是调节骨及软骨发育的关键因子,李娜等^[3]研究发现,BMP-2 在早期的骨诱导中作用重大,能够参与牙槽骨的改建,对于牙槽骨的缺损和牙损伤修复有促进作用。刘东宁等^[4]通过体外实验认为,PNS 或许是通过 BMP-2 表达水平的提高,在成骨细胞分化中起着关键作用。本实验通过建立兔子正畸牙移动模型,观察肌肉注射三七总皂苷对破骨细胞的影响以及对正畸牙牙周组织 BMP-2 蛋白的表达变化,以期对 PNS 加速正畸牙齿的移动提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 注射用血栓通(冻干,成分为三七总皂苷)(广西梧州制药集团股份有限公司)、兔抗 BMP-2 单克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司)、超敏二步法免疫组化检测试剂、浓缩型 DAB 试剂盒、胰蛋白酶消化液(北京中杉金桥生物技术有限公司)、抗酒石酸酸性磷酸酶染液(北京索莱宝生物科技有限公司)、HE 染色试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)。

1.2 实验分组,建模及给药 选用 3~6 月龄雄性新西兰兔 32 只(由徐州医科大学实验动物中心提供,合格证编号:NO. 201603253)。观察 1 周后用于实验,随机分为实验组和对照组,每组分为 1 周、2 周、3 周、4 周 4 个亚组,每亚组 4 只。戊巴比妥钠溶液经耳缘静脉注射进行全身麻醉后,在下颌左右第一前臼齿和门牙之间安放力值为 80 g 的正畸镍钛拉簧,并将 2 颗门牙结扎在一起作为一个整体,以下颌前牙为支抗建立下颌双侧第一前磨牙近中移动的模式。根据给药剂量(每日 40 mg/kg)和体重把每天所注射的 PNS 量计算出来,然后肌注给药,1 次/

日,空白对照组则依照等体积生理盐水的量注射。自开始正畸治疗起,每天肌注用药,一直用药到兔子处死前 1 d。

1.3 标本制备,牙周组织观察及破骨细胞数目分析 分别于正畸牙移动 1 周,2 周,3 周,4 周 4 个时间点分别处死各组动物取材。把兔移动的第一前臼齿连同骨组织一并截取,用 4% 多聚甲醛浸泡,经 10% EDTA(pH=7.4)溶液脱钙 6~10 周。石蜡包埋,组织切片,HE 染色光镜下察看张力侧,压力侧牙周组织,牙髓组织。TRAP 染色观察光镜下破骨细胞,每个标本随机选取 4 张切片,计算 4 个视野下破骨细胞数目总和的平均数为该样本的最终结果。

1.4 BMP-2 免疫组织化学染色 选取石蜡切片,常规脱蜡和复水,胰蛋白酶修复,3% H₂O₂ 去离子水孵育 10 min,PBS 缓冲液冲洗,5 min×3 次,先加一抗,4 °C 过夜,复温,再加二抗,室温孵育 30 min,滴加 DAB 显色,用不同梯度的乙醇脱水,二甲苯透明,封片,镜下观察切片,在牙根的张力侧和压力侧除根尖 1/3 以外的区域取 4 个视野(×100),必须随机。然后采用 Image-pro plus 6.0 图像分析系统计算各组牙周组织中阳性染色区域的 A 值。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件包进行统计学处理,若满足正态性和方差齐性,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 进行相关的统计学描述,同一组不同时间点结果的比较用单因素方差分析,同一时间点两组间结果比较采用两独立样本 *t* 检验;检验水准均为 $\alpha = 0.05$,当 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

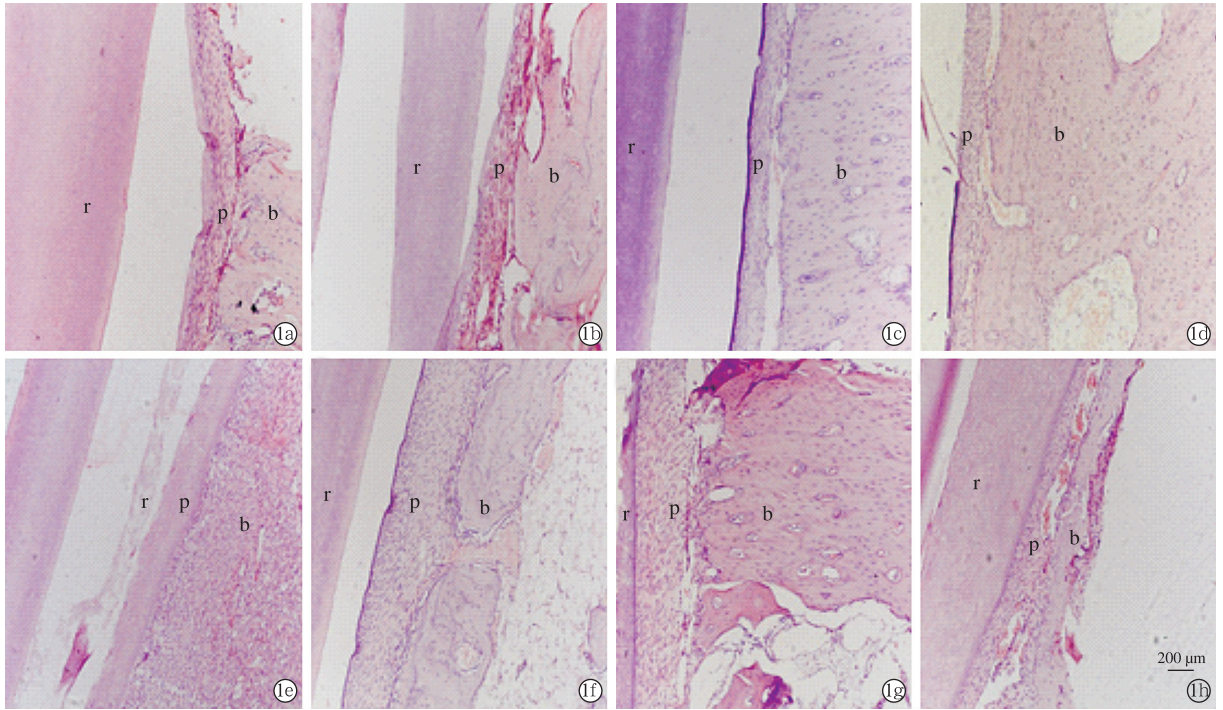
2.1 HE 染色结果 压力侧牙周膜间隙变窄,牙周膜纤维受压变形,紊乱,牙槽骨出现蚕食状吸收,破骨细胞出现在压力侧牙槽骨表面。实验组牙周纤维排列更加紊乱,牙槽骨吸收陷窝更加明显,距牙槽窝较远处的牙槽骨也出现大量骨吸收陷窝。实验组的破骨细胞体积也显著大于对照组,牙槽骨改建呈活跃状态,见图 1。

张力侧牙周膜间隙增宽,沿着牙槽骨表面可见成骨细胞线性排列,实验组相比于对照组牙周膜更宽,牙周韧带受牵拉,可以看到部分血管膨胀,成骨细胞与成纤维细胞更加活跃,胶原纤维排列更加疏松,见图 2。

2.2 TRAP 染色结果 破骨细胞通常在牙槽窝的表面,牙周韧带或 Howship 陷窝内,下图显示的是

经 TRAP 染色后的牙周组织检测结果,在光镜下($\times 100$)计算不同时期实验组与对照组压力侧破骨细胞的数目。其中黑色箭头所示的即是特异性染色

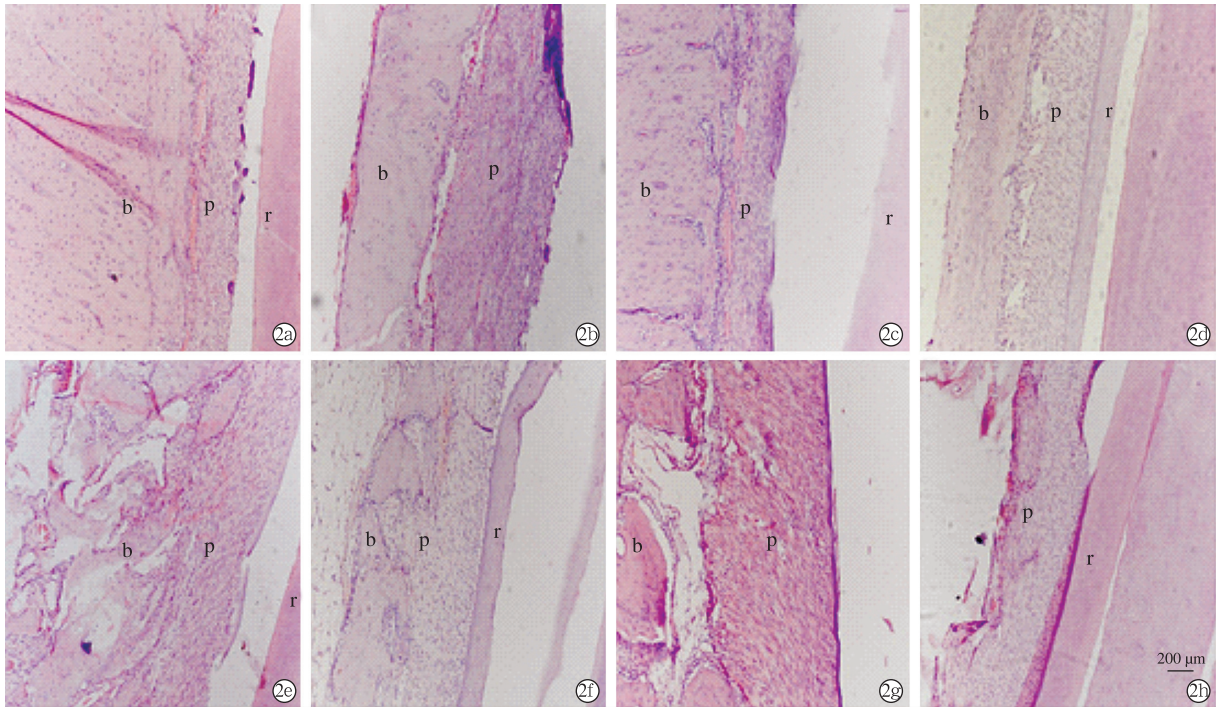
的破骨细胞,细胞的体积大,含有 2~50 个紧密堆积的核,细胞核不着色,细胞浆呈红染,见图 3、表 1、图 4。



b 代表牙槽骨,p 代表牙周膜,r 代表牙根

图 1 对照组(1a~1d)和实验组(1e~1h)在 7、14、21、28 d 时移动牙齿压力侧牙周组织的变化(苏木精-伊红染色 $\times 100$)

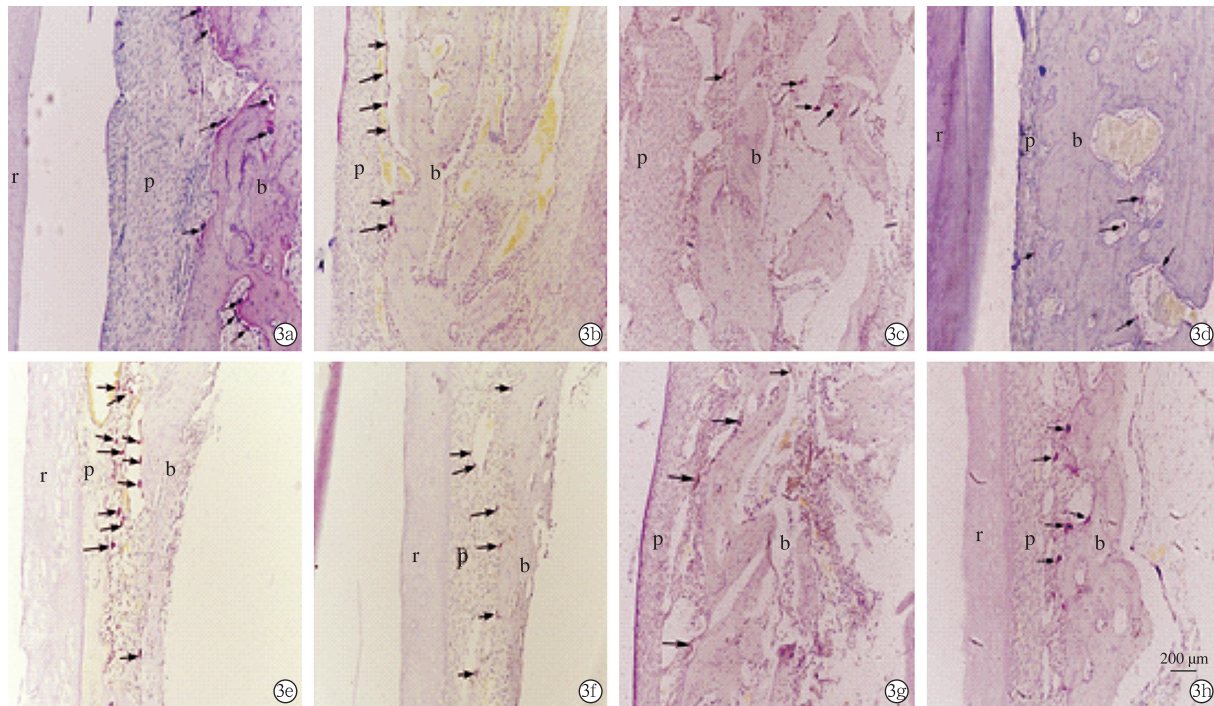
Fig. 1 Bone resorption at the compressive side of control group (1a-1d) and experimental group (1e-1h) on day 7, 14, 21, and 28, respectively.



b 代表牙槽骨,p 代表牙周膜,r 代表牙根

图 2 对照组(2a~2d)和实验组(2e~2h)在 7、14、21、28 d 时移动牙齿张力侧牙周组织的变化(苏木精-伊红染色 $\times 100$)

Fig. 2 Bone formation at the tension side of control group (2a-2d) and experimental group (2e-2h) on day 7, 14, 21, and 28, respectively.



b 代表牙槽骨, p 代表牙周膜, r 代表牙根, 黑色箭头所指为破骨细胞

图 3 对照组(3a~3d)和实验组(3e~3h)在 7、14、21、28 d 时移动牙齿压力侧破骨细胞的表达变化(TRAP 染色 ×100)

Fig. 3 TRAP+osteoclasts (black arrow) at the compressive side of control group (3a-3d) and experimental group (3e-3h) on day 7, 14, 21, and 28, respectively.

表 1 破骨细胞数目的比较

Table 1 Comparison of the number of osteoclasts $\bar{x} \pm s$

分组	1 周	2 周	3 周	4 周
对照组	9.00±1.291	8.00±0.82	8.75±0.96	5.75±0.50
实验组	19.50±1.291*	15.25±1.71*	10.00±0.82	6.00±1.41

注: * $P < 0.05$, 每组每批次 $n = 4$

表 1 显示的是对照组和实验组在 4 个观测点破骨细胞计数结果, 由表可以看出实验组的破骨细胞数量在第 1 周时达到高峰, 红染面积在第 1 周时最大, 实验组与对照组相比破骨细胞数量更多, 二者具有统计学差异 ($P < 0.05$), 随着时间的推移, 从第 2 周开始破骨细胞的数目逐渐下降, 但实验组破骨细胞数目仍然大于对照组, 二者具有统计学差异 ($P < 0.05$), 从第 3 周开始实验组破骨细胞数量大幅度减少, 第 3 周和第 4 周之后实验组和对照组破骨细胞数目相近, 无统计学差异。

2.3 BMP-2 的表达变化 牙周膜区 BMP-2 表达较强, 细胞质大面积染成棕黄色且呈带状分布, 免疫组化阳性表达区域主要集中于张力侧的牙周膜及牙槽骨区。BMP-2 的表达随加力时间的不同呈现一定的变化规律。实验组在第 1 周时 BMP-2 表

达量高于对照组, 且差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 在实验第 2 周时达到高峰, 实验组与对照组具有统计学差异 ($P < 0.05$), 随后 BMP-2 的表达逐渐降低, 第 3 周和第 4 周开始 BMP-2 的表达趋于平衡, 实验组和对照组之间差异无统计学意义。对照组内随着时间的变化, BMP-2 的表达量并无明显增强或减少, 差异无统计学意义, 证明三七总皂苷确实能促进牙周组织中 BMP-2 的蛋白表达, 见图 5、表 2。

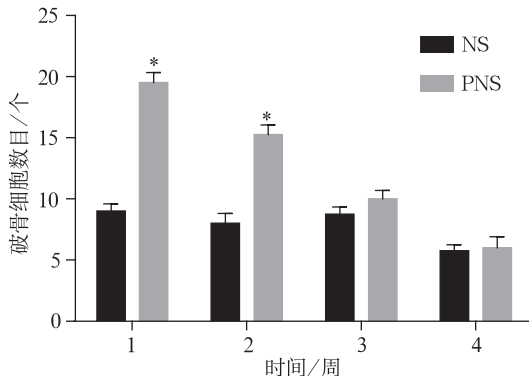
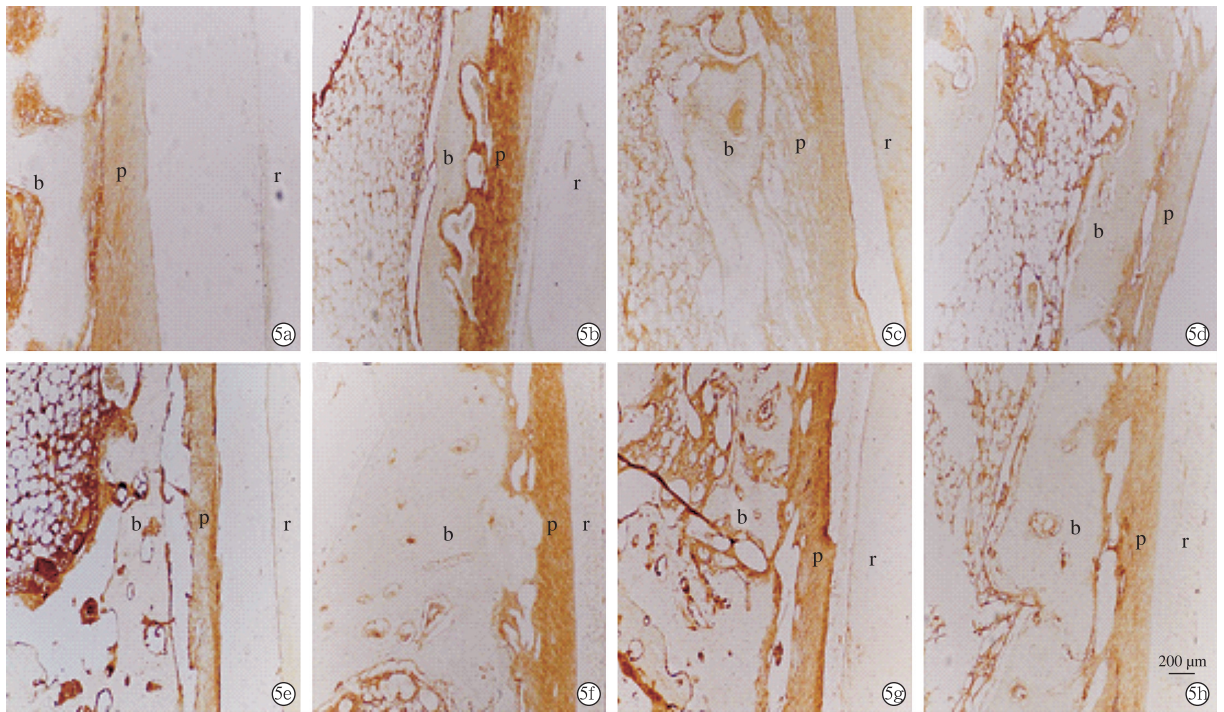


图 4 对照组与实验组 4 个时间点压力侧破骨细胞数目计数

Fig. 4 The number of osteoclasts on the compressive sides between control group and experimental group at four time points.



b 代表牙槽骨, p 代表牙周膜, r 代表牙根

图 5 对照组(5a~5d)和实验组(5e~5h)在 7、14、21、28 d 时移动牙齿张力侧 BMP-2 的表达变化(IHC ×100)

Fig. 5 Expression of BMP-2 at the tension side of control group (5a~5d) and experimental group (5e~5h) on day 7, 14, 21, and 28, respectively.

表 2 BMP-2 表达的平均光密度值的比较

Table 2 Comparison of the average optical density of BMP-2

组别	1 周	2 周	3 周	4 周	$\bar{x} \pm s$ P 值
对照组	0.059±0.004	0.067±0.003	0.056±0.015	0.055±0.0016	0.066
实验组	0.093±0.002*	0.149±0.017*	0.073±0.051	0.061±0.002	0.000
t 值	-12.641	-8.038	-1.883	-0.632	
P 值	0.001	0.001	0.133	0.562	

注: * $P < 0.05$, 每组每批次 $n = 4$

3 讨论

正畸牙齿移动,即外力作用于牙齿下,压力侧的牙槽骨不停地吸收,张力侧的牙槽骨不停地沉积,引起牙齿的移动。通过口腔相关实验的结果表明,PNS 在牙周膜干细胞^[5]及牙髓干细胞^[6]成骨分化中起着促进作用;PNS 能促进骨髓机制干细胞向成骨细胞的增殖、分化,在骨重建和促成骨中发挥重要作用^[7]。

BMP-2 在诱导间充质干细胞分化为软骨细胞和成骨细胞的过程中起着关键作用,同时还可以加快成骨细胞的增殖和分化,在破骨细胞的凋亡过程中也起着调节作用^[8,9]。此外一些研究也支持 BMP-2 对于牙周组织的再生修复以及牙槽骨的改建有积极的效果^[3]。本实验结果显示实验组从第 1 周开始 BMP-2 蛋白的表达高于对照组,第 2 周时达到高峰,随后蛋白的表达下降,第 3 周和第 4 周时

与对照组持平。BMP-2 被激活、释放之后,BMP-2 通过调节细胞的基因表达,促使成骨细胞的旁分泌与自分泌,张力区的成骨细胞也开始活跃起来,并且启动负反馈调节机制。故当牙周膜中 BMP-2 达到一定浓度后,BMP-2 刺激成骨源细胞分泌抑制剂,调控 BMP-2 的信号途径,减少了 BMP-2 的激活,使得从第 3 周开始 BMP-2 的表达开始下降^[10,11]。

三七总皂苷对破骨细胞的表达有何影响,国内外尚少见文献报道。本实验的研究表明,在应用三七总皂苷后,第 1 周时因机械力刺激导致压力侧为主的破骨过程活跃起来,第 2 周时破骨细胞数目有所下降,但仍然高于对照组,第 3 周和第 4 周时候,实验组的破骨细胞数目和对照组相近。我们的猜测是因为机械作用力的刺激,从而在牙齿移动的前期,使得压力侧的破骨细胞积极起来,随着三七总皂苷

的持续用药,药物或其代谢产物会不断的增加,2 周后三七总皂苷对破骨细胞的抑制作用开始占主导地位,因此,初始的 2 周是三七总皂苷加速牙齿移动的关键。

另外,刘嵘^[12]和 Pradhan 等^[13]通过体外研究得出 BMP-2 和破骨细胞的形成也有着重要的的关系,BMP-2 通过介导 RANKL/OPG 信号途径参与破骨细胞性骨吸收,且 BMP-2 对破骨细胞的促进作用是随着 BMP-2 处理浓度的增加而增强。从本实验的结果来看,BMP-2 的表达与破骨细胞的数目确实存在着某种相关关系,BMP-2 表达量高时,破骨细胞数目也多。

综上,该实验表明 PNS 对成骨细胞介导的骨形成和破骨细胞介导的骨吸收都有一定的促进作用。

参考文献

- [1] 张磊,李智尧,孙晋,等.三七总皂苷促进腱骨愈合的实验研究[J].中国骨伤,2011,24(2):132-136
- [2] Wenxi D, Shufang D, Xiaoling Y, et al. Panax notoginseng saponins suppress radiation-induced osteoporosis by regulating bone formation and resorption [J]. *Phytomedicine*, 2015,22(9):813-819
- [3] 李娜,刘蓉艳,李金源,等.骨形态发生蛋白对牙周组织改建影响的研究进展[J].河北联合大学学报(医学版),2012,14(2):185-186
- [4] 刘东宁,王云国,刘志礼,等.三七总皂苷对大鼠骨髓基质细胞骨形成蛋白-2 表达及碱性磷酸酶活性的影响[J].南昌大学学报(医学版),2012,52(9):9-13
- [5] 王萍,周玥,王亚平,等.人参皂苷 Rg1 促进人牙周膜干细胞增殖与成骨分化[J].第三军医大学学报,2013,35(15):1566-1569

- [6] Wang P, Wei X, Zhang F, et al. Ginsenoside Rg1 of Panax ginseng stimulates the proliferation, odontogenic/osteogenic differentiation and gene expression profiles of human dental pulp stem cells [J]. *Phytomedicine*, 2014, 21(2):177-183
- [7] Fan JZ, Wang Y, Meng Y, et al. Panax notoginseng saponins mitigate ovariectomy-induced bone loss and inhibit marrow adiposity in rats [J]. *Menopause*, 2015, 22(12):1343-1350
- [8] Marupanthorn K, Tantrawatpan C, Kheolamai P, et al. Bone morphogenetic protein-2 enhances the osteogenic differentiation capacity of mesenchymal stromal cells derived from human bone marrow and umbilical cord [J]. *Int J Mol Med*, 2017, 39(3):654-662
- [9] Barradas AM, Fernandes HA, Groen N, et al. A calcium-induced signaling cascade leading to osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(11):3205-3215
- [10] 郑园娜,王林红,谷志远.骨形态发生蛋白同源二聚体的研究概况及展望[J].生物医学工程学杂志,2010,27(6):1428-1432
- [11] 周骢,伍宝琴,朱中焰,等.正畸移动大鼠牙过程牙周组织中 PLAP-1、BMP-2 的表达及意义[J].口腔医学研究,2017,33(1):33-37
- [12] 刘嵘.重组人骨形成蛋白-2 和人牙周膜成纤维细胞对破骨样细胞形成的影响及作用机理[D].南方医科大学,2009
- [13] Pradhan BB, BAE HW, Dawson EG, et al. Graft resorption with the use of bone morphogenetic protein; lessons from anterior lumbar interbody fusion using femoral ring allografts and recombinant human bone morphogenetic protein-2 [J]. *Spine*, 2006,31(10):E277-E284

[收稿日期:2017-11-03]

(本文编辑 汪喻忠)

书讯

《现代牙槽外科新技术》由武汉大学口腔医学院口腔外科赵吉宏教授主编、上海交通大学附属第九人民医院口腔外科汪湧教授担任副主编,人民卫生出版社出版。本书介绍近年来用于牙槽外科临床的新技术、新业务,体现在诊疗理念和模式的更新、多种技术的联合应用以及学科间的交叉融合,具有技术新、范围广、学科交叉三大特色。主要包括现代影像技术在牙槽外科的应用、无痛麻醉技术、镇静镇痛技术、微创拔牙及超声刀、显微镜等辅助器械在牙拔除中的应用、阻生牙牵引拔除术;第三磨牙牙胚预防性拔除术、拔牙后即刻种植术、拔牙后牙槽骨保存和增量术、埋伏牙外科-正畸联合治疗、根尖周病变的牙体-外科联合治疗、颌骨囊肿内牙齿的袋形导萌术等,共十七章。

本书技术新、实用性强,既对相关理论或理念作了较全面的阐述,又有大量的临床病例佐证,全书配有 500 幅临床病例及临床操作实景图片,文字与图片相得益彰。因此本书特别适合于口腔外科青年医师、口腔通科医生、本科生、研究生、进修医生等人员学习和参考。