

红花加速正畸牙齿移动相关机制的初步研究

徐建光 沈 军 杨 梓 谢 晋 祝小鹏

摘要 选取 48 只 8 周龄雌性 SPF 级 Wistar 大鼠,建立大鼠正畸牙移动实验动物模型。随机分为红花组和对照组。红花组每日灌服 6 g/kg 红花水煎剂,对照组每日灌服 3 ml 生理盐水,每周加力一次。4 周后处死所有实验大鼠,分离大鼠上、下颌骨,测量上颌第一磨牙近中移动距离,并制作第一磨牙及相关牙周组织切片,采用免疫组织化学方法检测牙周组织中血管内皮生长因子(VEGF)的表达,并采用计算机图像分析方法对各组 VEGF 的表达强度进行半定量分析,同时测量下颌第一磨牙根尖区的骨密度,对所得实验数据进行统计学分析。红花组第一磨牙近中移动距离以及破骨细胞数大于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);VEGF 在红花组大鼠牙周组织中的表达明显高于对照组($P < 0.05$);两组下颌第一磨牙区的骨密度差异无统计学意义($P > 0.05$)。

关键词 红花;牙移动;Wistar 大鼠

中图分类号 R 783.5

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)09-1333-03

如何在生理允许范围内加速正畸牙齿移动,缩短疗程,是口腔正畸医师最为关心的问题之一。国内许多学者通过现代化研究手段发现,中药在骨折愈合过程中通过影响成骨细胞以及破骨细胞的形

成,加速骨组织的改建,从而促进骨折愈合^[1]。在正畸治疗过程中,正畸牙齿移动的本质就是成骨细胞与破骨细胞的作用,因此,该研究拟通过动物实验建立大鼠正畸牙齿移动模型,观察传统中药红花对正畸牙齿移动的影响并分析其相关机制。

1 材料与方法

1.1 红花水煎剂制备 选取红花 100 g,冷水浸泡 1 h 后煎煮两次,首次加水约为药量 10 倍,大火至煮沸后文火 30 min,滤出液体保留,第 2 次加水约为药量 8 倍,大火至煮沸后文火 20 min,滤出液体,并将两次滤液混合,文火开盖蒸馏至与原药量相等的毫升数,即 1 ml = 1 g 生药^[2],保存备用。

1.2 建立实验动物模型 选取 48 只 8 周龄雌性 SPF 级 Wistar 大鼠,体重 180 ~ 200 g,2% 氯氨酮注射液腹腔麻醉,将上颌两个中切牙视为一个整体,高速手机在整体牙冠的远中面、唇面和舌面的颈缘处各磨出平行龈缘且深约 0.2 mm 的浅沟,0.2 mm 的不锈钢结扎丝嵌入沟内结扎后局部清洁,GC Fuji 正畸粘接材料(日本 GC 公司)环绕结扎丝粘接,以防止结扎丝脱落。同时采用结扎丝环绕第一磨牙牙颈部并固定,并通过镍钛弹簧连接于中切牙,弹簧的拉伸力量为 0.5 N。矫治装置安装完成以后,大鼠饮食为非常规粉状饲料(钙 0.1%、磷 0.4%、维生素 D 2 000 IU/kg),饮消毒水,室温控制在 18 ~ 25 °C,湿

2014-06-04 接收

基金项目:安徽医科大学校基金(编号:2012XKJ021)

作者单位:安徽医科大学口腔医学院,安徽医科大学附属口腔医院,安徽省口腔疾病研究中心实验室,合肥 230032

作者简介:徐建光,男,讲师,主治医师,责任作者,E-mail: xujian-guang1982@yeah.net

The immunoenzymatic assay to detect lung cancer with peptides specifically binding to lung cancer cells

Zhang Yun^{1,2}, Wang Huasu^{1,2}, Xia Mizhen², et al

(¹School of Basic Medical Sciences, ²Dept of Biological Engineering, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract With A549 cells serving as target cells and helf cells as absorber cells, polypeptides specifically binding to lung cancer cells were screened out from Ph. D. -12TM Phage Display Peptide Library. Establish the immunoenzymatic assay (IEA) with the screened polypeptides replacing primary antibody, and the enzyme-marked anti phage antibody working as secondary antibody. After four rounds of panning and ELISA identification, the phage clone with best affinity and specificity to A549 cells was applied in the new method.

Key words phage display peptide library; A549 cells; lung cancer; immunoenzymatic assay

度约 56% ,12 ~ 12 h 间隔照明 ,室内噪声控制在 60 dB 以下 ,并且定期紫外线消毒及通风 ,每天检查矫治器有无脱落、损坏 ,每周加力一次 ,维持力值在 0.5 N ,持续 4 周。采用随机数字表以及随机数余数分组法 ,将 48 只 Wistar 大鼠随机分为红花组和对照组 ,红花组每日用灌胃器灌服 6 g/kg 红花水煎剂 ,对照组每日灌服 3 ml 生理盐水。

1.3 实验动物给药 采用插管经口灌胃给药方式 ,即用灌胃器 (由注射器和特殊的灌胃针构成) 将红花水煎剂直接灌注到大鼠的胃中。

1.4 实验数据获取 4 周后处死所有大鼠 ,分离上颌骨 ,测量大鼠上颌实验侧第一磨牙近中移动距离 ,同时制作第一磨牙及相关牙周组织切片 ,进行统计学分析。

1.4.1 上颌第一磨牙近中移动距离测量 用游标卡尺测量大鼠上颌实验侧第一磨牙与第二磨牙邻面接触点之间的距离 (精确到 0.01 mm) ,测量 5 次 ,取平均值作为最终结果。

1.4.2 组织学观察 制作大鼠上颌实验侧第一磨牙及相关牙周组织标本 ,置入 4% PFA/PBS 固定液 4 °C 中固定 24 h ,再用 19% EDTA 脱钙约 1 min ,系列乙醇脱水 ,二甲苯置换 ,石蜡包埋 ,然后用 Leica 切片仪顺着牙长轴的方向制备成近远中向 0.5 μm 厚的切片 ,HE 染色和免疫组织化学染色。

红花组和对照组每组 24 只大鼠 ,每只大鼠制作 2 张切片 ,共 96 张切片。由同一实验人员在光学显微镜下对每张切片随机选取第一磨牙牙根压力侧 10 个阳性破骨细胞的镜头 ,然后取平均值作为该张切片的破骨细胞数 ,将每组测量的结果取平均值作为改组的测量结果。采用计算机图像分析系统对不时期组织切片的 VEGF 表达强度进行定量分析。

1.4.3 下颌第一磨牙根尖区骨密度测量 采用 Norland 公司的 Stratec pDEXTA 骨密度仪 ,选择下颌第一磨牙根尖下约 0.15 mm² 的面积 ,测量其质量 ,得出牙槽骨密度值 ,对界面骨密度改变进行定量分析。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 11.0 软件进行分析 ,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示 ,选择两样本 *t* 检验比较两组实验数据。

2 结果

红花组与对照组上颌第一磨牙近中移动距离以及牙根周破骨细胞数差异有统计学意义 ($P < 0.01$) ; VEGF 在红花组大鼠牙周组织中的表达明显

强于对照组 ($P < 0.05$) ;下颌第一磨牙根尖区骨密度差异无统计学意义。见表 1、图 1、2。

表 1 两组上颌第一磨牙近中移动距离、牙根周破骨细胞数、VEGF 表达及下颌第一磨牙根尖区骨密度比较 ($\bar{x} \pm s$)

项目	红花组	对照组	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
近中移动距离 (mm)	1.54 ± 0.05	1.18 ± 0.06	4.653	< 0.001
破骨细胞数量 (个)	11.17 ± 0.05	9.18 ± 0.06	3.138	0.003
骨密度 (g/cm ²)	0.216 8 ± 0.000 6	0.217 1 ± 0.000 4	1.794	0.079
VEGF (pu)	105.0 ± 2.4	98.0 ± 2.5	2.694	0.010



图 1 红花组第一磨牙近中移动距离

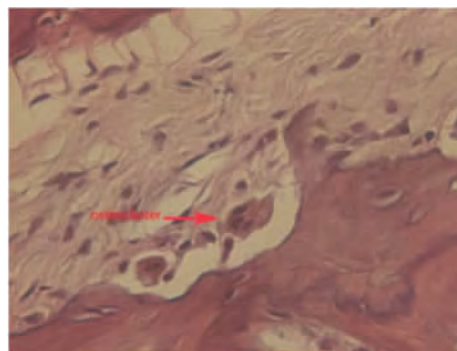


图 2 红花组第一磨牙牙周组织破骨细胞 SP × 400

3 讨论

本研究选择大鼠作为模型动物 ,对 King et al^[3] 建立的正畸牙移动实验动物模型进行了少许改进 ,将上颌两个中切牙视为一个整体 ,用 0.2 mm 的不锈钢结扎丝嵌入预留在中切牙颈部的槽沟内 ,结扎并用正畸粘接材料环绕结扎丝粘接 ,以防止结扎丝脱落。同时采用结扎丝环绕第一磨牙牙颈部并固定 ,并通过镍钛弹簧连接于中切牙 ,弹簧的拉伸力量为 0.5 N ,每周加力一次 ,以维持 0.5 N 的力量。

本研究选择插管经口灌胃给药方式 ,即用灌胃

器将红花水煎剂直接灌注到大鼠的胃中。灌胃器由注射器和特殊的灌胃针构成,用于大鼠的灌胃针长6~8 cm,直径为1~2 mm。在针的头部焊有一个小圆金属球,内为中空,以防止针头损伤大鼠器官,且针头金属球端弯成约20°的角度,以适应口腔、食道的生理弯曲。

正畸牙齿移动是一个复杂的机械力-生物信号的传递与转化过程,有大量的生物分子参与这个过程。目前研究^[4]表明,前列腺素类、神经递质、细胞因子以及白介素等生物信号分子参与了这个过程,通过调节破骨与成骨的作用来影响牙齿移动。传统中药与骨质改建的相关研究^[5]表明,在骨改建过程中,中药通过促进血管生成,从而刺激成骨细胞分化以及抑制破骨细胞形成影响骨改建。本研究结果显示,加力4周后红花组牙移动距离平均值为1.54 mm,大于对照组1.18 mm,差异有统计学意义,表明红花可以加速正畸牙齿的移动。另外,红花组第一磨牙根周破骨细胞数明显多于对照组,提示中药红花在牙齿移动过程中,能够刺激成骨细胞的分化,从而加速正畸牙齿移动。

骨密度值的基本含义是指将骨矿物质的数量除以被矿物质占据的骨投影区域的面积,该值反映了骨沉积水平。本研究中,红花组大鼠根尖区骨密度与对照组无明显差异,提示在短时间内,中药红花对

骨密度没有太大影响。

有研究^[6]表明,中药丹参是通过刺激 VEGF 的表达从而加速成骨细胞的分化,本研究显示红花组中 VEGF 在牙周组织中表达显著高于对照组,关于红花加速骨改建的分子生物学机制将是作者下一步研究的方向。

参考文献

- [1] 朱慧锋,王唯佳,王珠美. 骨碎补研究进展[J]. 中国骨伤, 2009 22(1): 66-8.
- [2] Xu Y Z, Qiu Y L, An Z G, et al. Role of the Chinese herbal medicine xianhuayin on the reversal of premalignant mucosal lesions in the golden hamster buccal pouch[J]. *Int J Oral Sci* 2010 2(1): 53-8.
- [3] King G J, Keeling S D, McCoy E A, et al. Measuring dental drift and orthodontic tooth movement in response to various initial forces in adult rats[J]. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1991 99(5): 456-65.
- [4] Aeschlimann D, Evans B A. The vital osteoclast: how is it regulated? [J]. *Cell Death Differ*, 2004, 11 Suppl 1: S5-7.
- [5] Chin A, Yang Y, Chai L, et al. Effects of medicinal herb *Salvia miltiorrhiza* on osteoblastic cells *in vitro* [J]. *J Orthop Res* 2011, 29(7): 1059-63.
- [6] Yang Y Q, Tan Y Y, Wong R, et al. The role of vascular endothelial growth factor in ossification[J]. *Int J Oral Sci*, 4(2): 64-8.

The pilot study of the mechanism of Safflower in the acceleration of tooth movement

Xu Jianguang, Shen Jun, Yang Zi, et al

(Stomatologic Hospital & College, Anhui Medical University, The Affiliated Stomatological Hospital of Anhui Medical University, Key Lab. of Oral Diseases Research of Anhui Province, Hefei 230032)

Abstract Forty-eight 8-week-old SPF female Wistar rats were chosen in the experiment. They were divided into two groups-Safflower group and control group randomly. In the Safflower group, each rat was drenched with Safflower decoction every day (6 g/kg); and in the control group, each rat was given 3 ml NS every day. The force of orthodontic appliances was enhanced every week. All rats were executed 4 weeks later and jaws were separated. The distances of the tooth movement were measured and slices from the periodontal tissue of the maxillary first molars were observed under the optical microscope. Immunohistochemical method was used to examine the expression of VEGF in the periodontal tissue. At the same time, the bone density of the apical area of the first molars was measured. Data were analyzed using method of statistics. The distances of the tooth movement in the Safflower group were greater than the control group. The number of osteoclasts in the Safflower group was more than the control group ($P < 0.05$). The expression of VEGF in the group of Safflower was significantly different compared with the control group ($P < 0.05$); there was no significant difference in the bone density ($P > 0.05$).

Key words Safflower; tooth movement; Wistar rat