

# 拔牙创愈合对邻近微种植体骨界面生长因子影响的研究\*

孙吉成<sup>1</sup>, 胡 贇<sup>1</sup>, 郑雷蕾<sup>1△</sup>, 赵志河<sup>2</sup>, 唐 甜<sup>2</sup>, 徐小淋<sup>1</sup>, 谢兵伍<sup>1</sup>

1. 重庆医科大学口腔医学院 口腔疾病与生物医学及重庆市重点实验室(重庆 401147);

2. 四川大学华西口腔医院 正畸科(成都 610041)

**【摘要】** 目的 通过检测模型犬邻近拔牙创微种植体骨界面与骨重建密切相关的生长因子——转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、骨钙素(OC)和核心结合因子基因(*Cbfa1*)等的表达,探讨拔牙创愈合对邻近微种植体骨界面生长因子的影响。**方法** 12只18月龄健康雌性比格犬,采取自身对照,建立邻近拔牙创植入微种植体实验动物模型(实验组),以非拔牙处植入微种植体为对照(对照组),分别于第1、3、8、12周依次处死,获得各带微种植体的组织块,采用免疫组织化学和原位杂交法,检测TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、OC蛋白和*Cbfa1*基因表达,并对其表达结果进行半定量分析。**结果** 实验组TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 蛋白以及*Cbfa1*基因表达在各检测时段均强于对照组,与对照组比较,1周时TNF- $\alpha$ 的表达,3周时TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 的表达差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ ),8周时*Cbfa1*基因的表达差异具有统计学意义( $P < 0.05$ );OC蛋白的表达两组均随着术后时间的延长表达增强,术后8周达高峰,术后3周时实验组表达弱于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论** 拔牙创邻近微种植体植入后早期炎症反应较重,但持续时间不长。骨界面骨改建进程随着愈合时间的增加持续活跃,过长的愈合时间会使骨形成相关因子表达削弱,在整个过程中种植体能保持稳定。

**【关键词】** 拔牙创 微种植体 转化生长因子- $\beta$  肿瘤坏死因子- $\alpha$  骨钙素 *Cbfa1*

**Influence of Healing Process of Extraction on Related Growth Factors in Microscrew-bone Interface of Implanted Titanium Microscrews Near the Extraction Wounds** SUN Ji-cheng<sup>1</sup>, HU Yun<sup>1</sup>, ZHENG Lei-lei<sup>1△</sup>, ZHAO Zhi-he<sup>2</sup>, TANG Tian<sup>2</sup>, XU Xiao-lin<sup>1</sup>, XIE Bing-wu<sup>1</sup>.

1. College of Stomatology, Chongqing Medical University, Chongqing Key Laboratory of Oral Diseases and Biomedical Sciences, Chongqing 401147, China; 2. Department of Orthodontics, West China Stomatological Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: zheng\_lei\_lei@163.com

**【Abstract】** **Objective** To detect the expression of growth factors relating to bone reconstructions in microscrew-bone interface of implanted titanium microscrews near the extraction wounds, and to determine the influence of healing process on the growth factors. **Methods** Eight male Beagle dogs (age 18 months) were divided into experimental and control groups. Titanium microscrews were implanted near an extraction wound in the dogs in the experimental group, while the controls had implantation without extraction wounds. The dogs were sacrificed at 1, 3, 8, 12 weeks, respectively. Immunohistochemistry and *in situ* hybridization sections were performed to detect the expression of TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , osteocalcin (OC) protein and *Cbfa1* mRNA. **Results** The experimental group had higher levels of expression of TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  protein and *Cbfa1* mRNA than the controls, with significant differences appearing at week one for TNF- $\alpha$  ( $P < 0.05$ ), week three for TGF- $\beta$  and TNF- $\alpha$  ( $P < 0.05$ ), and week eight for *Cbfa1* mRNA ( $P < 0.05$ ). The expression of OC increased over time and reached peak at week eight ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Microscrews implanted near extraction wounds can maintain stability. Severe inflammation occurs in the early stage of healing, but does not sustain. Bone remodeling remains active over the healing process. But prolonged healing phase without force loading could weaken the remodeling.

**【Key words】** Extraction wound Micro-implant TGF- $\beta$  TNF- $\alpha$  OC *Cbfa1*

支抗控制是正畸治疗成功的关键。微种植体支抗因其支抗的稳定性以及植入手术的简便性等,在正畸临床中得到越来越广泛的应用。拔牙内收患者,

拔牙创远中骨质区域行微种植体植入后,相关力学单位涉及移动牙、拔牙创和微种植体<sup>[1]</sup>。而对于拔牙创愈合涉及的骨质结构对于微种植体周围骨质愈合以及微种植体的稳定性有无影响?本课题组前期实验成功建立比格犬邻近拔牙创植入微种植体动物模型,相关生物力学、组织学观察和骨计量学研究<sup>[1,2]</sup>都显示这两种愈合过程有着明显的相关性,微种植体骨界面之骨吸收效应以及炎症反应均会因

\* 国家自然科学基金项目(No. 81000463, No. 81470772)、重庆市自然科学基金(一般)项目(No. cstc2012jja10053)、重庆市医学科研项目(No. 20141013, No. 2013-2-068)和重庆市医学科研计划项目(No. 2012-2-126)资助

△ 通讯作者, E-mail: zheng\_lei\_lei@163.com

拔牙创之早期愈合而加重,即刻加载之风险较大。

研究<sup>[3,4]</sup>发现,骨和软骨组织中含有多种细胞因子,包括成纤维细胞生长因子(FGF)、转化生长因子(TGF)、肿瘤坏死因子(TNF)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、白介素(IL)和 $\gamma$ 干扰素(IFN- $\gamma$ )等。骨组织内上述各种细胞因子其含量和分布均不相同,且各种对软骨及骨具有特异性作用之骨源性细胞生长因子,均在骨组织内有所表达,如软骨源性生长因子、骨生长因子以及骨形态发生蛋白等。某一细胞所分泌的细胞生长因子,其往往不仅可作用在其本身细胞,而且尚可以作用至其他的靶细胞。因此,作为骨组织内的局部调节介质,各细胞因子参与软骨及骨的改建及代谢,其可以经自分泌或者旁分泌方式所进行。

本实验选取与骨重建密切相关生长因子 TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、骨钙素或称骨钙蛋白(OC)和核心结合因子基因(*Cbfa1*),通过对其表达的检测,从分子生物学水平上更深层次讨论拔牙创愈合和微种植体植入两种骨创伤过程的相互影响。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验动物

选取 12 只健康雄性比格犬(重庆医科大学实验动物中心提供),体质量 13~14 kg,年龄 18 月,下颌第 4 前磨牙无缺失,无牙体及牙周疾病。所有比格犬均于笼中经特殊饲养,采取定时及定量方式给予摄食,而饮水自由。经适应性饲养 1 周之后,进入实验<sup>[2,5]</sup>。

### 1.2 主要试剂及实验器材

Aarhus microcrew 自攻型纯钛微种植钉(德国 Medicon 公司);青霉素钠(石家庄华北制药);速眠新 II(军事兽医研究所,长春);氯氨酮(石家庄华北制药);70%~100%酒精、4%多聚甲醛液(体积分数,pH7)、氯仿溶液、过氧化苯甲酰、邻苯二甲酸二丁酯、二甲苯及甲基丙烯酸甲酯(昊化化工,上海);脱钙液(10%甲醛 92 mL+浓硫酸 8 mL);I 抗(TGF- $\beta$ :兔抗狗 IgG,SC-146,SANTA CRUZAE;TNF- $\alpha$ :羊抗狗 Ig G,北京莱博生物实验材料研究所;OC:小鼠抗狗单抗,MAB-1419,R/D);II 抗(封闭用正常羊血清原液及生物素化羊抗鼠/兔抗原液,超敏 SP 试剂盒,Kit-0305,福州迈新生物技术公司);犬 *Cbfa1* 基因(NCBI GenBank);原位杂交检测试剂盒(MK1030,武汉博士德);高速涡轮机(CS181,上海);硬组织切片机(LEICA 1600,德

国);常规轮转石蜡切片机(LEICA 2125,德国);Nikon EM1200 显微镜;Nikon ACT-1 采图软件;Image-Pro Plus5.0 专业图像分析系统等。

### 1.3 邻近拔牙创植入微种植体动物模型的建立

研究采取自身对照,12 只比格犬实验微种植体在每只比格犬拔除下颌第 3、4 双尖牙后的拔牙区域植入(实验组),在每只比格犬下颌第 2 双尖牙、第 1 磨牙区域即以非拔牙处植入微种植体为对照(对照组)。具体动物模型建立过程参考课题组前期相关实验<sup>[1,6]</sup>。实验过程中未发现有微种植体松动。植入后第 1、3、8、12 周,依次处死 3 只比格犬。所有比格犬均根据中国重庆医科大学动物伦理委员会试验协议进行处置。

### 1.4 获取标本及处理

各组动物处死后,将带有微种植钉的下颌骨取下,采用试验用涡轮机将标本修整为组织块,大小 10 mm $\times$ 10 mm $\times$ 6 mm,无软组织且包含一微种植体及其周边至少 4 mm 骨质。然后采用高速涡轮机将牙齿釉质磨除,4%多聚甲醛液将组织块固定 1 周(加 0.1%DEPC)。之后采用 15%乙二胺四乙酸(加 0.1%DEPC)行脱钙处理。每间隔 7 d 行一次换液。3 个月之后,组织块变软,但有弹性,这时将组织块中微种植钉旋转取出,然后将组织块距微种植钉螺纹边缘 1 mm 之外组织去除。接着再行 1 个月脱钙。之后将组织块放入 70%的酒精 2 缸各处理 1 h;常规梯度酒精脱水(70%、80%、90%、100%酒精各 1 h),正丁醇透明 6 h,60 $^{\circ}$ C 浸于石蜡 6 h,之后行石蜡包埋处理。采用石蜡切片机固定组织块,之后连续切片,切片厚度为 4  $\mu$ m。

### 1.5 免疫组织化学染色

采用免疫组织化学染色法,检测标本组织中 TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、OC 的表达。取标本切片放入染色筐中,二甲苯 I、II、III 各 15 min 脱腊,100%酒精 I、II 中各 10 min,95%酒精 5 min,90%酒精 5 min,80%酒精 5 min,70 酒精 5 min,蒸馏水浸洗进行水化。切片置入 PBS-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>液(0.01 mL,pH 7.0,PBS 99 mL+30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mL)中 20~30 min,清除内源性过氧化物酶活性,然后经 PBS 洗涤切片。将 0.1%胰蛋白酶液过滤,并在水浴中预热至 37 $^{\circ}$ C,室温下(37 $^{\circ}$ C)消化时间 25 min,暴露细胞内抗原。用 PBS 洗涤 4 次(5 min/次),然后滴加适当稀释后的 I 抗,将切片放在保湿盒中置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱内过夜孵育,PBS 洗涤切片 3 次,2 min/次。滴加 II 抗,II 抗采用封闭用正常羊血清原液;生

物素化羊抗鼠/兔抗原液,37℃孵育 30 min,PBS 洗涤切片 3 次,2 min/次。用针对 I 抗的生物素化 II 抗孵育切片。滴加 SP 试剂后进行 DAB 显色,然后切片放入自来水中,流水轻冲洗 10 min,再经蒸馏水洗后,放入苏木素中做核复染(显色切片),经 70%、80%、90%、95%、100% I、100% II 酒精脱水各 5 min,二甲苯透明处理,树胶封片。采用 PBS 代替 I 抗作为阴性对照组,而自身阳性作为阳性对照。

### 1.6 原位杂交(POD 法)检测 *Cbfa1* 基因表达

由 NCBI GenBank 提供犬 *Cbfa1* 基因,由上海申能生物工程公司标记并合成探针,5'-端做地高辛修饰。探针合成后经质量检测,开盖前短暂离心,加入经 DEPC 处理的 ddH<sub>2</sub>O 稀释至浓度为 10 pmol/μL,-20℃ 储存备用。探针序列为:5'-gcgaggggcagcacagagcacaggaag-3'。取 1.4 中标本切片,切片上滴加 3% 柠檬酸新鲜稀释的胃蛋白酶(1 mL 3% 柠檬酸加 2 滴浓缩型胃蛋白酶,混匀),37℃ 孵育 30 min。胃蛋白酶消化后 37℃ 固定 10 min(1% 多聚甲醛;0.1 mol/L PBS,pH 7.0~7.6;含 1/1 000 DEPC)。蒸馏水洗涤 3 次。行预杂交后,将杂交液 20 μL(含地高辛配基标记的 mRNA 核酸探针浓度 2 μg/mL)滴于切片组织上加盖硅化的盖玻片。放在盛有少量 2×SSC 溶液的湿盒中,恒温箱 38~42℃,16~18 h。杂交后行以下处理:2×SSC 液内振动移除盖片;2×SSC 37℃ 5 min×2;0.5×SSC 37℃ 15 min×1;0.2×SSC 37℃ 15 min×1 或 2 次;滴加 0.5% 封阻试剂,37℃,10 min,甩去多余液体,不洗;滴加生物素化鼠抗地高辛抗体,37℃,60 min;PBS 洗涤 37℃ 5 min×4;滴加 SABC,37℃,30 min;PBS 洗涤 37℃ 5 min×4;滴加生物素化过氧化物酶,37℃,30 min;PBS 洗涤 37℃ 5 min×4;之后进行 DAB 显色、核复染、脱水、透明、树胶封片,方法同前述免疫组织化学染色部分。

### 1.7 图像采集及组织蛋白、基因的半定量分析

免疫组织化学和原位杂交切片均进行半定量分

析。采用 Image-pro plus 图像分析系统,400 倍镜同一光强度下,对所获取免疫组织化学切片观察,随机在绕微种植钉的边界选取 5 个视野,对阳性信号(细胞具有清晰的结构,完整的形态,呈特异性棕黄色的胞浆,着色水平明显较背景水平为高)之积分光密度进行测量分析,取其平均值。

### 1.8 统计学方法

数据用  $\bar{x} \pm s$  表示。采用两样本 *t* 检验(two-sample *t* test)比较两组间差异, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 犬拔牙创微种植体术后不同时间骨界面组织 TGF-β 和 TNF-α 的表达

见表 1 及图 1。邻近拔牙创微种植体骨界面实验组犬 TGF-β 表达(图 1A)在术后第 3 周达到峰值,随后经历一个平台期,在第 12 周时下降( $P < 0.05$ )。术后第 3 周时,实验组 TGF-β 表达强于对照组( $P < 0.05$ ,图 1B)。对照组 TGF-β 表达峰值出现在第 8 周,随后表达减弱直至与第 3 周水平相当。

实验组和对照组在植入后前 3 周 TNF-α 呈强表达(图 2A,2B),并随时间推移呈下降趋势,在第 8 周时出现谷值,在植入第 1、3 周,实验组 TNF-α 表达强于对照组( $P < 0.05$ )。

### 2.2 犬拔牙创微种植体术后不同时间骨界面组织 OC 蛋白和 *Cbfa1* mRNA 的表达

OC 蛋白的表达在实验组(图 3A)和对照组(图 3B)随着时间的延长表达增强,在第 8 周达到顶峰,随后出现减弱。在植入后第 3 周两组间比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),对照组 OC 蛋白表达强于实验组。组内比较显示,实验组和对照组组内相邻时间点 OC 蛋白表达的差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 2。

*Cbfa1* mRNA 表达两组均在第 3 周出现高峰,至第 8 周实验组(图 4A)表现为平台期,对照组(图 4B)则出现明显表达减弱。组内比较显示,实验组

表 1 各组不同时间 TGF-β 和 TNF-α 的表达比较

Table 1 Comparison of the expression of TGF-β and TNF-α between the two groups at different times

	TGF-β			TNF-α		
	Experimental group	Control group	<i>P</i>	Experimental group	Control group	<i>P</i>
1 week	26 454.4±4 411.1	21 298.1±2 962.9	0.100	36 548.4±1 653.3	31 803.2±1 665.2	0.007
3 weeks	37 892.7±1 863.9*·#	32 890.3±2 087.3*	0.012	33 990.8±842.7	29 311.6±1 836.1	0.004
8 weeks	37 234.2±594.3*·#	36 170.7±340.0*·#	0.055	2 4048.1±1 820.7△	21 391.6±1 787.1△	0.082
12 weeks	33 189.5±2 502.2*	32 946.6±1 190.9*	0.867	26 546.5±1 291.0△	26 296.5±2 628.8△	0.870

\*  $P < 0.05$ , vs. 1 week in the same group; #  $P < 0.05$ , vs. 12 weeks in the same group; △  $P < 0.05$ , vs. 1 and 3 weeks in the same group

*Cbfa1* mRNA 表达除了在第 3、8 周之间差异无统计学意义,其余各时间段之间差异均有统计学意义

( $P < 0.05$ )。对照组第 3 周 *Cbfa1* mRNA 表达高于其余各时间段( $P < 0.05$ )。见表 2。

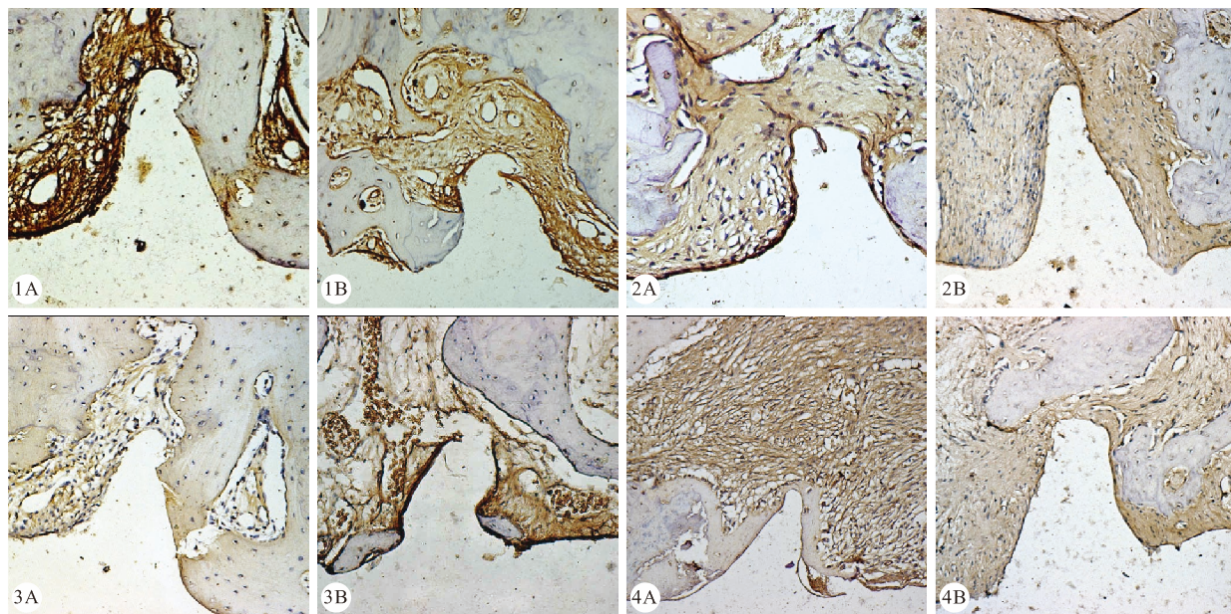


图 1 植入 3 周 TGF-β 表达。SP × 200      图 2 植入 3 周 TNF-α 表达。SP × 200      图 3 植入 3 周 OC 蛋白表达。SP × 200  
图 4 植入 3 周 *Cbfa1* mRNA 表达。SP × 200

Fig 1 The expression of TGF-β at 3 weeks. SP × 200      Fig 2 The expression of TNF-α at 3 weeks. SP × 200      Fig 3 The expression of OC at 3 weeks. SP × 200      Fig 4 The expression of *Cbfa1* mRNA at 3 weeks. SP × 200

A; Experimental group; B; Control group

表 2 各组不同时间 OC 蛋白和 *Cbfa1* mRNA 的表达比较

Table 2 Comparison of the expression of OC protein and *Cbfa1* mRNA between the two groups at different times

	OC protein			<i>Cbfa1</i> mRNA		
	Experimental group	Control group	<i>P</i>	Experimental group	Control group	<i>P</i>
1 week	15 451.4 ± 3 317.1	14 867.2 ± 2 187.8	0.779	24 854.4 ± 2 024.7	24 648.1 ± 2 531.0	0.903
3 weeks	20 266.5 ± 1 277.0*	25 048.1 ± 2 457.8*	0.014	37 942.7 ± 1 129.5#▲	35 290.3 ± 2 682.2△	0.118
8 weeks	32 026.5 ± 2 946.5*	30 037.0 ± 1 625.8*	0.282	37 427.5 ± 1 674.3#▲	27 528.3 ± 2 267.2	0.000
12 weeks	26 296.5 ± 1 499.9*	27 796.5 ± 1 257.1*	0.176	32 511.4 ± 2 252.6#	28 543.2 ± 2 428.5	0.054

\*  $P < 0.05$ , vs. the neighbor time point in the same group; #  $P < 0.05$ , vs. 1 week in the same group; △  $P < 0.05$ , vs. 12 weeks in the same group

### 3 讨论

TGF-β 被认为是激发骨骼创伤修复的诱导因子, TGF-β 在骨的形成及重建过程中, 因其对软骨、成骨、破骨以及间充质前体细胞的协调作用, 而具有非常关键的作用。TGF-β 主要通过抑制核因子 κB 受体活化因子配体(RANKL)表达, 下调 RANKL/骨保护素(OPG)的比例, 从而促使成骨过程。本实验中, TGF-β 在微种植体植入各期的表达均比较明显, 说明各时期成骨过程都比较活跃。在第 3 周时实验组的表达远远高于对照组, 这可能是由于拔牙创伤后血肿形成并机化时, 血小板脱颗粒释放 TGF-β<sup>[7]</sup> 以刺激骨膜生发层细胞分裂增殖, 这些被

释放的 TGF-β 也可以迁移到位于其附近的微种植体区域。实验组 TGF-β 高峰在第 3 周左右, 并持续到第 8 周。文献中报道, 当骨骼创伤修复进入软骨形成阶段后, TGF-β 基因表达在软骨痂形成期成熟软骨细胞表达量最高<sup>[8]</sup>。这说明在拔牙创附近的微种植体在第 3 周左右就有成熟的软骨细胞形成。实验组在植入 8 周后, 对照组植入 12 周后, TGF-β 的表达出现减弱, 而钙化的基质中很少含有 TGF-β, 说明骨界面已逐渐钙化, 这和 OC 在这段时期的表达可以互相印证。

TNF-α 为一种单核因子, 在一定程度上反映骨吸收的状态。TNF-α 在早期炎症反应中具有非常重要的作用, 其可以加重早期炎症反应, 从而使得早

期炎症水平不断提高;TNF- $\alpha$  还能促使成纤维细胞有丝分裂水平加快,提高成纤维细胞数量,从而使得伤口愈合得以加速。Li 等<sup>[9]</sup> 研究发现被敲除核因子  $\kappa$ B 受体活化因子(RANK)基因的小鼠,当注入 TNF- $\alpha$  后,破骨细胞会在所注射部位周围形成。研究发现<sup>[10,11]</sup>,OPG 并没有抑制 TNF- $\alpha$  诱导破骨细胞形成的过程,这说明 TNF- $\alpha$  可以直接诱导破骨细胞的形成,这种途径和 RANKL/RANK/OPG 途径并不相同。Sabokbar 等<sup>[12]</sup> 研究发现,当 OPG 及 RANK 存在的时候,TNF- $\alpha$  在诱导破骨细胞形成以及产生吸收陷窝方面具有重要作用,而 IL-1 则具有增强破骨细胞活性的重要作用。因此,TNF- $\alpha$ /IL-1 能够诱导破骨细胞的形成,其机理和 RANKL/RANK/OPG 途径并不尽相同。本实验中,实验组和对照组 TNF- $\alpha$  在植入后第 1 周表达最强烈,这是因为 TNF- $\alpha$  能够促进早期炎症反应,提高早期炎症水平。实验组表达强于对照组,说明拔牙后引发的局部炎症可以影响位于其附近的微种植体,两者的炎症过程起协同作用。这种现象一直延续到植入后 3 周,结合 TGF- $\beta$  的表达在第 3 周达到峰值,我们认为在植入后 3 周,骨重建表现为骨吸收和骨形成同时活跃的进程,而位于拔牙创附近的微种植体这种效应最为明显。值得一提的是,在第 12 周时,虽然 TGF- $\beta$  出现减弱趋势,TNF- $\alpha$  表达却出现回弹,这种现象可能是因为无载荷愈合时间过长,局部骨质缺乏相应刺激而导致骨吸收趋势占上风。

OC 蛋白又称骨钙素 osteocalcin 或者骨谷氨酸蛋白,其反映成骨细胞的功能,其敏感性、特异性均较强,目前国际上已公认 OC 蛋白是反映骨形成的重要的生化标志物。OC 蛋白的表达主要在基质矿化早期、新形成的骨组织以及成熟的成骨细胞中。在成骨细胞启动矿化后 OC 蛋白的表达才有较为明显的增高<sup>[13]</sup>。本实验中,OC 蛋白的表达在植入后初期无论是对照组还是实验组表达均不太明显,这是因为 OC 蛋白的表达一般主要始于成骨细胞其成熟过程的基质矿化期开始之后。拔牙和植入过程激活一系列细胞因子,启动骨重建,间充质细胞分化成骨细胞,但幼稚的成骨细胞分泌 OC 蛋白功能不强,因此在植入后初期,OC 蛋白表达呈现出一种较弱的表现。随着时间的推移,成骨细胞逐渐成熟,当其开始向矿化发生期分化时,OC 蛋白的表达达到高峰,而这一时段本实验提示在植入后第 8 周左右。在第 3 周,对照组 OC 蛋白表达强于实验组,这说明拔牙在愈合头 3 周内可能会延迟界面新骨钙化的过

程。

*Cbfa1* 属于 Runt 结构域基因家族<sup>[14]</sup>,由于它在骨形成过程中扮演了不可缺少的作用,因此又被称为成骨细胞特异性转录因子<sup>[15]</sup>。OPG/RANKL/RANK 系统是骨重建进行的一个重要通路,而 OPG 以及 RANKL 基因其启动子上均含有 *Cbfa1* 基因的结合位点,它对成骨以及破骨细胞在骨重建过程中的耦联作用有着重要保证,故其对骨代谢完整性的保持具有非常重要的作用。因此,对 *Cbfa1* mRNA 的检测有助于说明微种植体周骨重建的活跃程度。本实验中,*Cbfa1* mRNA 表达在第 1 周时各组均不明显,这说明在植入初期界面反应主要为一个炎症反应,相关骨重建的 OPG 和 RANKL 分泌可能尚未完全启动。随着时间的延长,在第 3 周时 *Cbfa1* mRNA 表达迅速增加,达到峰值,这说明植入后骨重建最活跃时间在植入后 3 周左右。虽然这种高强度表达在第 3 周时检测差异无统计学意义,但实验组将这种强表达一直维持到第 8 周,而对照组则在第 8 周表现减弱。这说明拔牙创释放的骨重建相关因子刺激骨界面 OPG 和 RANKL 分泌可以维持较长时间,这对微种植体稳定性是有利的。

综上所述,本实验从微观角度研究检测微种植体——骨界面相关生长因子蛋白和基因表达,探讨拔牙创愈合对其邻近微种植体稳定性影响的分子生物学机制,研究结果表明拔牙创愈合释放相关生长因子与微种植体——骨界面的愈合过程具有协同作用,早期加重炎症反应,而拔牙创附近微种植体骨界面活跃的骨形成过程持续时间更长。这也提示我们邻近拔牙创植入微种植体可以保持稳定性,但即刻加载风险较大,过长的无载荷愈合时间(>2 月)对界面骨整合不利,建议临床加载时间选定在一次复诊时间之后(1 月)。

## 参 考 文 献

- 1 郑雷蕾,胡 赟,宋锦璘等.犬拔牙创愈合对相邻微种植体最大拉力值的影响.第三军医大学学报,2011;33(11):1106-1109.
- 2 霍金凤,郑雷蕾,胡 赟等.拔牙创愈合过程对邻近微种植体稳定性影响的组织学研究.第三军医大学学报,2012;34(17):1715-1718.
- 3 Zhou FH, Foster BK, Sander G, et al. Expression of proinflammatory cytokines and growth factors at the injured growth plate cartilage in young rats. Bone, 2004; 35(6): 1307-1315.
- 4 Goldring MB, Goldring SR. Skeletal tissue response to cytokines. Clin Orthop Relat Res, 1990; (258): 245-278.
- 5 Schwarz F, Herren M, Sager M, et al. Comparison of

- naturally occurring and ligature induced peri-implantitis bone defects in humans and dogs. *Clin Oral Implants Res*, 2007; 18(2):161-170.
- 6 Zheng L, Tang T, Deng F, *et al.* The Influence of extraction on the stability of implanted titanium microscrews: a biomechanical and histomorphometric study. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2009; 24(2):267-274.
- 7 姬洪全, 党耕町, 马庆军等. 骨折愈合过程中转化生长因子  $\beta 1$  表达的实验研究. *中华外科杂志*, 1998; 36(2):72-73.
- 8 Sarahrudi K, Thomas A, Mousavi M, *et al.* Elevated transforming growth factor-beta 1 (TGF- $\beta 1$ ) levels in human fracture healing. *Injury*, 2011; 42(8):833-837.
- 9 Li J, Sarosi I, Yan XQ, *et al.* RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000; 97(4):1566-1571.
- 10 Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, *et al.* Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. *J Exp Med*, 2000; 191(2):275-286.
- 11 Zou W, Hakim I, Tschopp K, *et al.* Tumor necrosis factor-alpha mediates RANK ligand stimulation of osteoclast differentiation by an autocrine mechanism. *J Cell Biochem*, 2001; 83(1):70-83.
- 12 Sabokbar A, Itonaga I, SG Sun, *et al.* Arthroplasty membrane-derived fibroblasts directly induce osteoclast formation and osteolysis in aseptic loosening. *J Orthop Res*, 2005; 23(3):511-519.
- 13 Baumgrass R, Williamson MK, Price PA. Identification of peptide fragments generated by digestion of bovine and human osteocalcin with the lysosomal proteinases cathepsin. *J Bone Miner Res*, 1997; 12(3):447-455.
- 14 Kamamoto M, Machida J, Miyachi H, *et al.* A novel mutation in the C-terminal region of RUNX2/CBFA1 distal to the DNA-binding runt domain in a Japanese patient with cleidocranial dysplasia. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2011; 40(4):434-437.
- 15 Zhang C, Dai H, de Crombrughe B. Characterization of Dkk1 gene regulation by the osteoblast-specific transcription factor Osx. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012; 420(4):782-786.
- (2014-07-22 收稿, 2014-09-27 修回)
- 编辑 沈进
- 
- (上接第 178 页)
- 20 黄毅岚, 杨虹, 汪世梅. 百令胶囊治疗早期糖尿病肾病的系统评价. *药物研究*, 2012; 21(20):18-21.
- 21 Mundel P, Reiser J, Zuniga Mejia Borja A, *et al.* Rearrangements of the cytoskeleton and cell contacts induce process formation during differentiation of conditionally immortalized mouse podocyte cell lines. *Exp Cell Res*, 1997; 236(1):248-258.
- 22 Noh EM, Kim JS, Hur H, *et al.* Cordycepin inhibits IL-1 beta-induced MMP-1 and MMP-3 expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Rheumatology*, 2009; 48(1):45-48.
- 23 陈朝红, 刘志红, 洪亦眉等. 雷公藤甲素干预 C5b-9 诱导足细胞损伤的体外研究. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 2009; 18(4):310-314.
- 24 Welsh GL, Saleem MA. Nephrin-signature molecule of the glomerular podocyte? *J Pathol*, 2010; 220(3):328-337.
- 25 邓跃毅, 陈以平, 贺学林等. 冬虫夏草制剂延缓慢性肾衰竭的机理研究. *中国中西医结合肾病杂志*, 2001; 2(7):381-383.
- 26 Ding C, Tian P, Jia L, *et al.* The synergistic effects of C. Sinensis with CsA in preventing allograft rejection. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2009; 14:3864-3871.
- 27 Zhang ZH, Wang XW, Zhang YN, *et al.* Effect of Cordyceps sinensis on renal function of patients with chronic allograft nephropathy. *Urologia Internationalis*, 2011; 86(3):298-301.
- 28 罗娜, 白云, 周静然等. 小胶质细胞人补体攻膜复合物亚溶破模型制作及功能鉴定. *第四军医大学学报*, 2006; 27(10):872-874.
- 29 Zhang MH, Fan JM, Xie XS, *et al.* Ginsenoside-Rg1 protects podocytes from complement mediated injury. *J Ethnopharmacol*, 2011; 137(1):99-107.
- 30 Somlo S, Mundel P. Getting a foothold in nephritic syndrome. *Nat Genet*, 2000; 24(4):333-335.
- 31 Doublier S, Ruotsalainen V, Salvio G, *et al.* Nephric redistribution on podocytes is a potential mechanism for proteinuria in patients with primary acquired nephritic syndrome. *Am J Pathol*, 2001; 158(5):1723-1731.
- 32 Luimula P, Ahola H, Wang SX, *et al.* Nephric in experimental glomerular disease. *Kidney Int*, 2000; 58(4):1461-1468.
- 33 Patrakka J, Ruotsalainen V, Ketola I, *et al.* Expression of nephric in pediatric kidney diseases. *J Am Soc Nephrol*, 2001; 12(2):289-296.
- 34 Coward RJ, Foster RR, Patton D, *et al.* Nephrotic plasma alters slit diaphragm-dependent signaling and translocates nephric, podocin, and CD2 associated protein in cultured human podocytes. *J Am Soc Nephrol*, 2005; 16(3):629-637.
- 35 Zheng R, Deng Y, Chen Y, *et al.* Astragaloside IV attenuates complement membranous attack complex induced podocyte injury through the MAPK pathway. *Phytother Res*, 2012; 26(6):892-898.
- 36 Stambe C, Nikolic-Paterson DJ, Hill PA, *et al.* P38 mitogen-activated protein kinase activation and cell localization in human glomerulonephritis: correlation with renal injury. *J Am Soc Nephrol*, 2004; 15(2):326-336.
- (2014-07-29 收稿, 2014-09-28 修回)
- 编辑 沈进