

正畸驱动的骨皮质切开术对巨噬细胞的作用及机制研究

王 燕^{1,2}, 朱琳琳^{1,2}, 王思雨^{1,2}, 张舒婷^{1,2}, 孙 雯¹, 李 琥², 张瀚文^{3*}, 严 斌^{1,2*}

¹南京医科大学口腔疾病研究江苏省重点实验室, 江苏 南京 210029; ²南京医科大学附属口腔医院正畸科, 江苏 南京 210029; ³南京医科大学基础医学院, 江苏 南京 211166

[摘要] 目的: 研究正畸牙周围骨皮质切开所诱导的局部微环境对巨噬细胞产生的生物学作用。方法: 将60只大鼠随机分成骨皮质切开辅助正畸组和传统正畸组各30只, 加力后分别于3、5、7、14、21 d处死实验动物并对颌骨进行Micro-CT扫描, 三维重建后测量移动牙周围牙槽骨骨密度, 并通过免疫组化染色技术, 观察牙周组织中CD68、CD11b、CD86及CD163阳性细胞数。将112只8周龄成年雄性C57BL/6小鼠随机分成牙槽骨皮质切开组及对照组各56只, 并分别于3、5、7、14、21、28、42 d处死实验动物并取新鲜的牙槽骨组织悬液与小鼠腹腔巨噬细胞共培养, RT-PCR检测CD11b、CD68、白介素(IL)-6、IL-1 β 、IL-10及精氨酸酶(Arg)-1的mRNA表达, Western blot检测信号通路相关蛋白p65以及STAT3磷酸化水平。结果: 牙槽骨皮质切开初期, 骨皮质切开辅助正畸组和传统正畸组大鼠牙槽骨密度均降低, 且前者明显低于后者($P < 0.05$), 同时免疫组化染色显示, 前者CD68、CD11b、CD86及CD163阳性细胞比率显著高于后者($P < 0.05$)。与牙槽骨组织悬液共培养后, 牙槽骨皮质切开组巨噬细胞表面标记物CD11b和CD68的表达量在共培养第3天开始逐渐增多, 在14 d左右达到峰值并显著高于对照组($P < 0.05$); M1型巨噬细胞标记物IL-6及IL-1 β 及M2型巨噬细胞标记物IL-10及Arg-1表达量在14 d左右到达峰值且显著高于对照组($P < 0.05$)。p65蛋白以及磷酸化的STAT3蛋白表达量分别于共培养第5、7天和第7、14天显著高于对照组($P < 0.05$)。结论: 正畸驱动的骨皮质切开术通过活化并促进巨噬细胞的分型进而影响牙槽骨密度并促进牙齿的移动, 其中NF- κ B及JAK-STAT信号通路的激活可能发挥重要作用。

[关键词] 牙槽骨; 骨皮质切开; 正畸牙移动; 炎症; 巨噬细胞; 骨密度

[中图分类号] R782.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)05-582-08

doi: 10.7655/NYDXBNS20180503

Effects of orthodontically drivencorticotomy on macrophages and its mechanism

Wang Yan^{1,2}, Zhu Linlin^{1,2}, Wang Siyu^{1,2}, Zhang Shuting^{1,2}, Sun Wen¹, Li Hu², Zhang Hanwen^{3*}, Yan Bin^{1,2*}

¹Jiangsu Key Laboratory of Oral Disease of NMU, Nanjing 210029; ²Department of Orthodontics, Affiliated Hospital of Stomatology, NMU, Nanjing 210029; ³School of Basic Medical Sciences, NMU, Nanjing 211166, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the biological effects of corticotomy-induced micro-environment around orthodontic teeth on macrophages. **Methods:** A total of 60 male Wistar rats were randomly divided into the experimental group (TM+CO) and control group (TM) with each group of 30 rats. The rats in each group were sacrificed after 3, 5, 7, 14 and 21 days for tissue collection and assessments. Micro-CT examination was performed to acquire bone mineral density (BMD) around the upper left first molars, to analyze the change of bone remodeling. Morphological changes of periodontal tissues and the expression of CD68, CD11b, CD86, CD163-positive cells were determined by immunohistochemistry. A total of 112 male C57BL/6 mice of eight-week old were randomly divided into the corticotomy group and the vehicle group. The mice in each group were sacrificed after 3, 5, 7, 14, 21, 28 and 42 days for tissue collection and co-culture. The relative mRNA expression of CD11b, CD68, IL-6, IL-1 β , IL-10 and Arg-1 were respectively evaluated by RT-PCR. The protein change of p65 and STAT3 phosphorylation were detected by Western blot. **Results:** The value of BMD in both groups decreased significantly at the early stage and it was more obvious in the TM + CO group ($P < 0.05$). Meanwhile, the immunohistochemistry data showed that the expressions of CD68, CD11b, CD86, CD163-positive cells in the TM+CO group were all significantly increased compared with those in the TM group at day 3 ($P < 0.05$). The real-time PCR analysis showed that the mRNA

[基金项目] 国家自然科学基金(81571005); 江苏省高等学校自然科学研究重大项目(17KJA320003); 江苏省“333高层次人才培养工程”(BRA2016511); 江苏省高校优势学科建设工程资助项目

*通信作者(Corresponding author), E-mail: byan@njmu.edu.cn; hanwenzhang@njmu.edu.cn

expression levels of CD11b and CD68 in macrophages were significantly higher in the corticotomy group than those in the vehicle group ($P < 0.05$); they increased from day 3 to day 14 and then declined. Moreover, the mRNA expression levels of M1 marker, TNF- α , IL-1 β and M2 marker, IL-10, Arg-1 were significantly higher in the corticotomy group compared with those in the vehicle group ($P < 0.05$); they increased up to day 14 and then declined. Western blot analysis showed that the level of p65 was upregulated after co-culture with condition medium of maxilla in the corticotomy group early on day 5 and day 7, while the level of phosphorylated STAT3 was upregulated on day 7 and day 14 when compared with those in the vehicle group ($P < 0.05$). **Conclusion:** The activation of NF- κ B and JAK-STAT signaling pathways may play an important role in corticotomy induced infiltration and polarization of macrophages and thereby influenced bone density and consequent orthodontic tooth movement.

[Key words] alveolar bone; corticotomy; orthodontic tooth movement; inflammation; macrophage; bone mineral density

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(05):582-589]

不整齐的牙齿及不完美的笑容不仅影响颜面部的美观及功能,而且影响人们正常的社交活动^[1-2],因此越来越多的患者开始寻求正畸治疗。美国正畸医师协会2007年的统计数据显示,正畸治疗时间通常为18~30个月,患者普遍希望可以缩短治疗时间;同时正畸治疗疗程过长,会显著增加疼痛不适感、龋坏^[3]、牙龈退缩^[4]及牙根吸收^[5]的发生率。而作为一种能够显著加速牙齿移动并缩短正畸治疗时间的方法,骨皮质切开术目前受到了越来越多的关注和应用^[6-7]。

正畸驱动的骨皮质切开术通过对上下颌牙槽骨形成直接损伤加速牙移动。近年来研究表明,该过程伴随手术局部无菌性炎症反应的产生,且骨皮质切开术愈合的最初阶段以炎症细胞的浸润为主要标志^[8],而巨噬细胞作为炎症反应中一类重要的效应细胞,已经逐渐被人们所重视^[9]。

在巨噬细胞对牙槽骨骨代谢作用方面,一些研究已经证实,在正畸过程中,巨噬细胞数量和牙槽骨骨转化率呈正相关^[10]。Brooks等^[11]通过外源性注射巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF),发现M-CSF主要通过作用于单核巨噬细胞,并刺激其向破骨细胞前体细胞分化,提高牙齿移动速率。He等^[12]通过建立小鼠正畸牙移动模型,发现在正畸加力后,M1型巨噬细胞可促进骨吸收,从而促进牙槽骨吸收和牙移动。但目前对于巨噬细胞与骨皮质切开加速正畸牙移动之间的相互作用尚未见报道,特别是对于骨皮质切开局部加速现象中伴随的局部微环境变化及其对于巨噬细胞的作用并不清楚。本实验选择Wistar大鼠建立骨皮质切开加速正畸牙移动及传统正畸模型,进行骨密度检测并通过免疫组化技术分析牙周组织中巨噬细胞浸润及分型变化;同时选择C57BL/6小鼠进行骨皮质切开,取新鲜牙槽骨组织悬

液与巨噬细胞共培养,探究骨皮质切开加速正畸牙移动过程的局部微环境对巨噬细胞的作用。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

格鲁玛酸蚀剂(上海贺利氏公司),正畸粘结剂(3M公司,美国),正畸结扎用不锈钢丝(杭州西湖巴尔公司),超弹镍钛拉簧(上海埃蒙迪公司),水合氯醛粉剂(北京国药集团),BCA检测试剂盒(Thermo公司,美国),DMEM培养基、DPBS、双抗及胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(Gibco公司,美国)。兔抗鼠CD68、CD11b、CD86、CD163一抗及相应二抗(Abcam公司,美国),免疫组化试剂盒DAB显色剂(DAKO公司,美国)。兔抗鼠p65、STAT3、磷酸化STAT3(p-STAT3)、GAPDH抗体(Cell Signaling Technologies公司,美国),IgG二抗(Santa Cruz公司,美国),PCR试剂盒(大连宝生物工程有限公司),0.22 μ m过滤器(Millipore公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物

选取SPF级,雄性8周龄Wistar大鼠66只,体重220~240 g;雄性8周龄C57BL/6小鼠112只,由北京维通利华实验动物技术有限公司供给。将66只Wistar大鼠随机分成骨皮质切开辅助正畸组和传统正畸组各30只,以及空白组6只。传统正畸组仅行正畸牵引($F=60$ g),骨皮质切开辅助正畸组除行同等力量牵引,加行骨皮质切开术。两组大鼠又按加力时间长短分为3、5、7、14、21 d 5个亚组,每组6只,大鼠左侧上颌为实验侧,右侧为空白对照。将112只8周龄成年雄性C57BL/6小鼠随机分成2组:牙槽骨皮质切开组及对照组各56只,按照时间点分为3、5、7、14、21、28、42 d 7个亚组,每组8只。

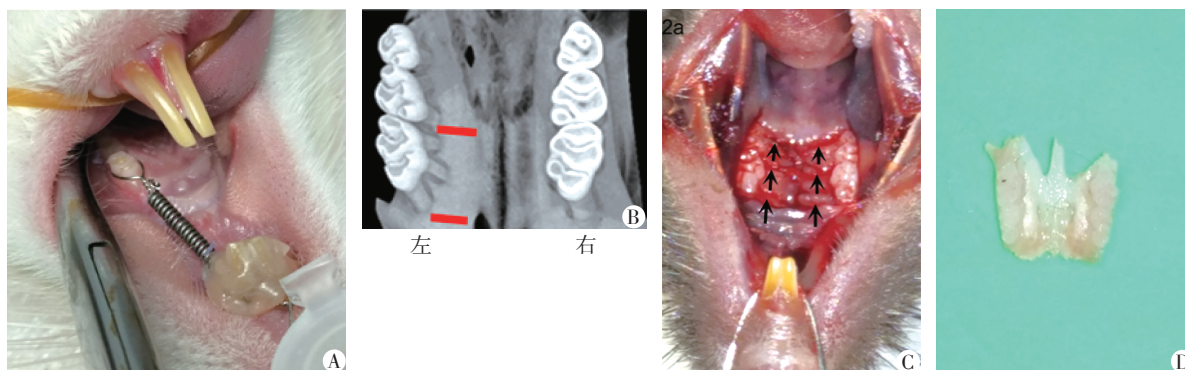
1.2.2 模型建立

传统正畸组大鼠经10%水合氯醛腹腔麻醉,充分暴露口腔并选择左侧上颌第一磨牙为研究对象。用0.25 mm结扎丝将NiTi拉簧固定于左侧上颌第一磨牙和上颌切牙之间,并用光固化树脂对切牙上的结扎丝进行加固,用测力计测量牵引力为60 g,牵引第一磨牙近中移动(图1A)。骨皮质切开辅助正畸组大鼠完成以上操作后,继续用手术刀在第一磨牙腭侧近远中作垂直切口,近中距牙齿约1 mm,远中位于第一、二磨牙间,切口长约7 mm,穿透牙龈,深达骨膜下1 mm(图1B)。每日使用生理盐水冲洗左上颌第一磨牙、切牙及拉簧。牙槽骨皮质切

开组小鼠经4%水合氯醛腹腔麻醉,充分暴露口腔。在上颌第一、第二和第三磨牙腭侧近中作垂直切口,切口长约3 mm,穿透牙龈,深达骨膜下1 mm(图1C)。每日使用生理盐水冲洗上颌磨牙。

1.2.3 样本采集

所有大鼠分别在第3、5、7、14、21天注射过量麻醉药处死,并将大鼠上颌骨完整取出,4%多聚甲醛固定48 h后,进行Micro-CT扫描分析及组织学检测。所有小鼠分别在第3、5、7、14、21、28、42天注射过量麻醉药处死,并将小鼠上颌骨完整取出(图1D),加入含1%血清的DMEM培养液中,用研磨法制成单细胞悬液后,无菌条件下0.22 μm 过滤器过



A:左上颌第一磨牙加载正畸加力装置;B:骨皮质切开辅助正畸组大鼠手术情况,红色标记处为骨皮质切开部位;C:牙槽骨皮质切开组小鼠上颌磨牙腭侧骨皮质切开手术情况,箭头所示为骨皮质切开部位;D:小鼠新鲜的上颌骨。

图1 动物模型的建立

Figure 1 The establishment of animal model

滤后得无菌牙槽骨组织溶液。

1.2.4 腹腔巨噬细胞的分离、培养

将8周龄、SPF级C57BL/6小鼠处死并置于75%酒精中浸泡3 min后,用预冷的5 mL DPBS灌洗腹腔;1 000 r/min离心5 min后收集细胞,用含10% FBS的DMEM完全培养基重悬细胞,计数后铺至细胞培养板中,待细胞贴壁后4 h,用DPBS洗2遍,除去其他未贴壁细胞,饥饿12 h后将新鲜的牙槽骨组织悬液与巨噬细胞共培养。

1.2.5 Western blot检测

收集不同时间点共培养后的巨噬细胞立刻进行细胞全蛋白提取,通过BCA法进行蛋白浓度测定。用10%的分离胶进行SDS-PAGE电泳,通过湿转法将蛋白转印至PVDF膜上,5%的脱脂奶粉室温封闭,分别给予一抗p65、p-STAT3、T-STAT3以及GAPDH进行4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,TBST洗5 min,共3次,给予对应的IgG二抗室温孵育1 h,TBST洗5 min,共3次,加底物显影液发光显影,选取GAPDH作为内

参,通过对比蛋白灰度值进行分析。

1.2.6 荧光实时定量PCR检测

收集不同时间点共培养后的巨噬细胞,通过TRIzol试剂(Invitrogen公司,美国)并根据说明书进行细胞RNA提取,检测RNA浓度与纯度并立刻使用TaKaRa的逆转录试剂将总RNA逆转录为cDNA,通过TaKaRa的SYBR PCR试剂在ABI 7900实时定量PCR仪(Applied Biosystems公司,美国)进行实时定量PCR。引物序列为:CD68, Forward: 5'-CACTTCGGGCCATGTTTCTCTTG-3', Reverse: 5'-AGGGGCTGGTAGGTTGATTGTCGTC-3'; CD11b, Forward: 5'-TAATGACTCTGCGTTTGCCCTG-3', Reverse: 5'-ATTGGAGCTGCCACAATGAG-3'; 白介素(IL)-1 β , Forward: 5'-ACGGACCCCAAAAGATGAAG-3', Reverse: 5'-TTCTCCACAGCCACAATGAG-3'; IL-6, Forward: 5'-CAAAGCCAGAGTCCTTCAGAG-3', Reverse: 5'-GCCACTCCTTCTGTGACTCC-3'; 精氨酸酶(Arg)-1, Forward: 5'-GCTCAGGTGAATCGGCCT-

TTT-3', Reverse: 5'-TGGCTTGCGAGACGTAGAC-3'; IL-10, Forward: 5'-GCCCTTTGCTATGGTGTCTTTTC-3', Reverse: 5'-TCCCTGGTTTCTCTTCCCAAGAC-3'; GAPDH, Forward: 5'-AGAACATCATCCCTGCATCC-3', Reverse: 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'。反应程序设置为95℃, 10 min, 95℃, 15 s, 60℃, 1 min (40个循环)。以GAPDH为内参基因,目的基因相对表达量通过公式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算和分析。

1.2.7 Micro-CT扫描分析

所有样本均在同一条件下接受同一Micro-CT仪器(Skyscan 1176, Bruker公司,德国)扫描,扫描参数如下:电压50 kV,电流500 μ A,体素大小为17.76 μ m。由1名单盲操作者随机编码所有Micro-CT数据并重命名,将.bmp文件导入dataviewer (Bruker公司,德国)进行三维重建,然后将重建数据导入CTan (Bruker公司,德国),测量双侧上颌第一磨牙周围牙槽骨结构,本研究选取牙颈部、根中及根尖3个水平作为测量平面(图2A),每个平面选取第一磨牙近中及第一、二磨牙之间2个测量区域,每个样本共测量12个位点。在CT上圈出12个区域的骨组织(排除牙及牙周膜),作为感兴趣区(regional of interest, ROI),测量骨密度(bone mineral density, BMD)。为确保测量结果的可靠性,所有测量值间隔1周后由同1位测量者重复测量。所有图像均在21.5英寸显示屏(4590, Dell公司,美国)上进行分析。BMD均以左侧(干预侧)测量值减去右侧(空白侧)测量值作为结果,若为正,则骨密度增加,若为负,则骨密度降低。

1.2.8 组织学检测

将固定标本置于EDTA脱钙液内脱钙,随后进行组织梯度脱水,常规石蜡包埋。每个标本沿垂直于第一磨牙长轴方向进行组织切片。组织切片经脱蜡,抗原修复,3%过氧化氢阻断内源性过氧化物酶,3%BSA室温封闭后,加一抗,分别用兔抗鼠CD68、CD11b、CD86和CD163,4℃孵育过夜,加二抗(HRP标记),室温孵育50 min, DAB显色,自来水冲洗终止显色,苏木素复染,冲洗,1%盐酸酒精分化,冲洗,0.6%氨水返蓝,冲洗,酒精二甲苯脱水透明,晾干封片。随机选择5个区域进行拍摄,用Image-Pro Plus 6.0图像分析系统软件测定每个区域阳性染色细胞及组织的总面积。

1.3 统计学方法

所有数据用SPSS19.0软件进行分析,骨密度、细胞因子表达、组织学检测及蛋白表达灰度值的测

量采用组内相关检验来验证结果的可靠性,通过计算组内相关系数(ICC)来测量和评价信度的大小,ICC值均大于0.85,说明信度是可靠的,然后用独立样本 t 检验对实验组和对照组进行差异分析,统计结果均以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 牙槽骨结构的变化

由Micro-CT图像(图2B)可见,第3天开始,骨皮质切开辅助正畸组磨牙近远中即开始出现密度减低区域,第5天密度进一步降低,第7天时,骨质破坏区域密度开始增高,第14天时,密度又出现明显减低现象,第21天时又有所恢复。传统正畸组的根周骨密度变化影像并不明显。

2.2 骨密度分析

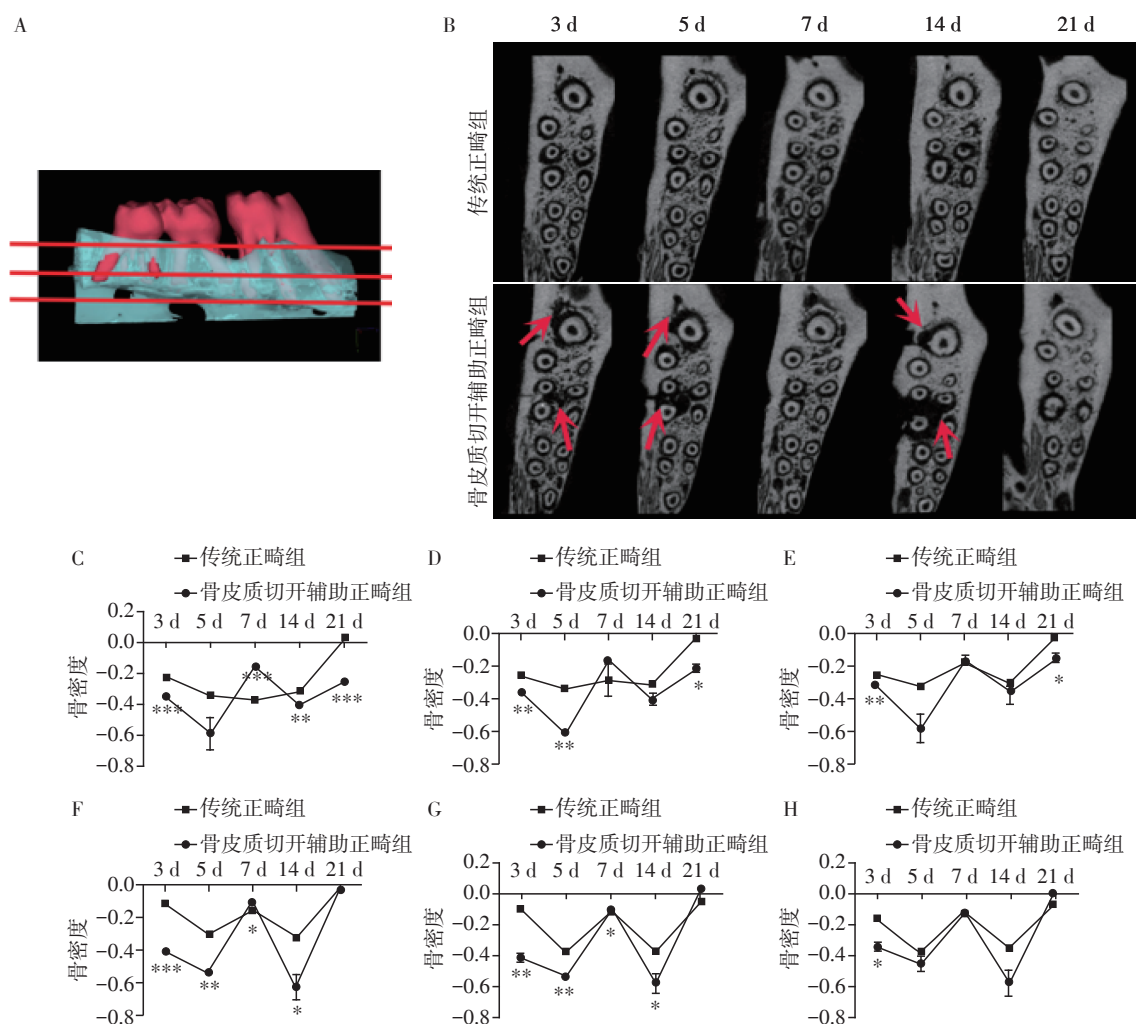
近远中3个位点密度变化趋势基本相似,且骨皮质切开辅助正畸组和传统正畸组的变化趋势也表现出一致性,但密度差异有统计学意义($P < 0.05$),表现为传统正畸组近中侧骨密度初期少量下降,7~14 d略有恢复,21 d时显著恢复并稳定在0左右(图2C~E);而远中侧骨密度变化趋势与近中侧相似,但在7 d时出现明显恢复,而后有明显下降。而在骨皮质切开辅助正畸组,第3天开始,磨牙近、远中即开始出现明显的密度减低,第7天时,明显增高并有所回升,而后密度又出现明显降低现象,且远中持续下降并出现谷值,减少量从牙颈部至根尖部递减,14~21 d逐渐回升(图2F~H)。上述结果表明,骨皮质切开术加速正畸的作用主要依赖于对骨密度改变,特别是骨密度降低过程的调控而实现。并且这种调控主要发生在正畸手术的早中期,提示其手术作用存在时空特异性。

2.3 牙周组织学观察

通过免疫组化染色可见,第3天时,骨皮质切开辅助正畸组棕黄色的CD68及CD11b阳性细胞比率显著高于传统正畸组(图3A、B);同时棕黄色的CD86及CD163阳性细胞率也显著高于传统正畸组,且此时加力初期CD86阳性细胞率更高(图3A、C)。

2.4 牙槽骨组织悬液共培养后巨噬细胞中各因子的表达

为研究骨皮质切开过程中所形成的局部微环境对巨噬细胞活化及其分型的影响和作用,通过将新鲜牙槽骨组织悬液与鼠源腹腔巨噬细胞(peritoneal macrophage, PM)共培养并运用real-time PCR分析巨噬细胞分型情况。结果显示,在牙槽骨皮质切



A:第一磨牙测量平面;B:根中部平面,箭头所示为密度明显降低区域;C:近中侧牙颈水平;D:近中侧根中水平;E:近中侧根尖水平;F:远中侧牙颈水平;G:远中侧根中水平;H:远中侧根尖水平。与传统正畸组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。

图2 牙槽骨结构及骨密度的变化

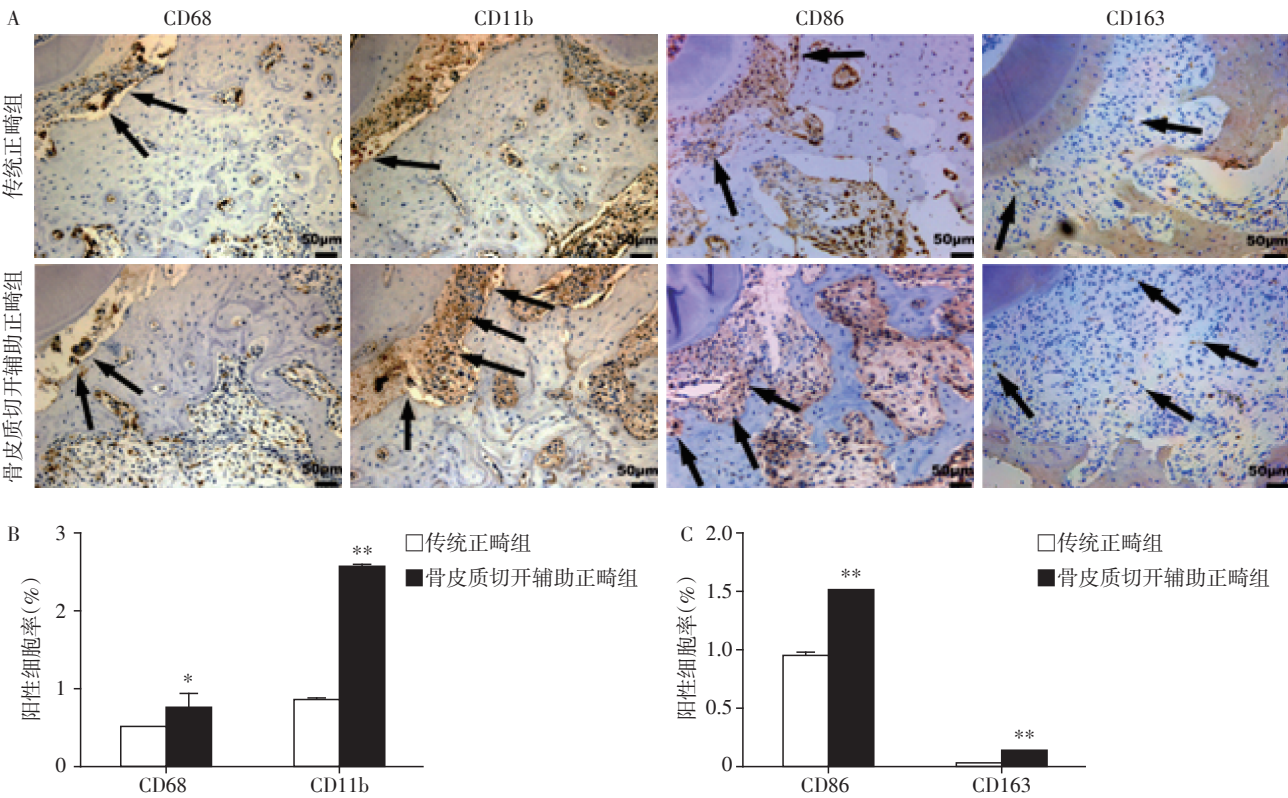
Figure 2 The structure and the bone mineral density

开共培养组,巨噬细胞表面标记物 CD11b 和 CD68 表达量在共培养第3天时开始逐渐增多,7~14 d 左右达到峰值并明显高于对照组,21 d 后两者表达量开始减弱,28 d 后表达量对照组基本持平(图 4A、B),说明在共培养条件下牙槽骨组织悬液能够增加巨噬细胞表面标记物的表达。同时,我们发现,与对照组相比,牙槽骨皮质切开共培养组 M1 型巨噬细胞相关因子 IL-6 及 IL-1 β 表达量在初期 3~5 d 时即显著高于对照组,7~14 d 左右到达峰值后开始减弱,28 d 后表达量与对照组相比无显著性差异(图 4C、D);而 M2 型巨噬细胞相关因子 IL-10 及 Arg-1 表达量在第 5 天同样开始显著升高,7~14 d 左右到达峰值,28 d 后表达量无显著性差异(图 4E、F)。上述结果表明,骨皮质切开后牙槽骨组织悬液的局部微环境能够对巨噬细胞分型产生作用,表现为 M1 和

M2 型巨噬细胞均增多,进一步提示,骨皮质切开术加速正畸牙移动是通过活化巨噬细胞并促进巨噬细胞的分型来发挥作用的。

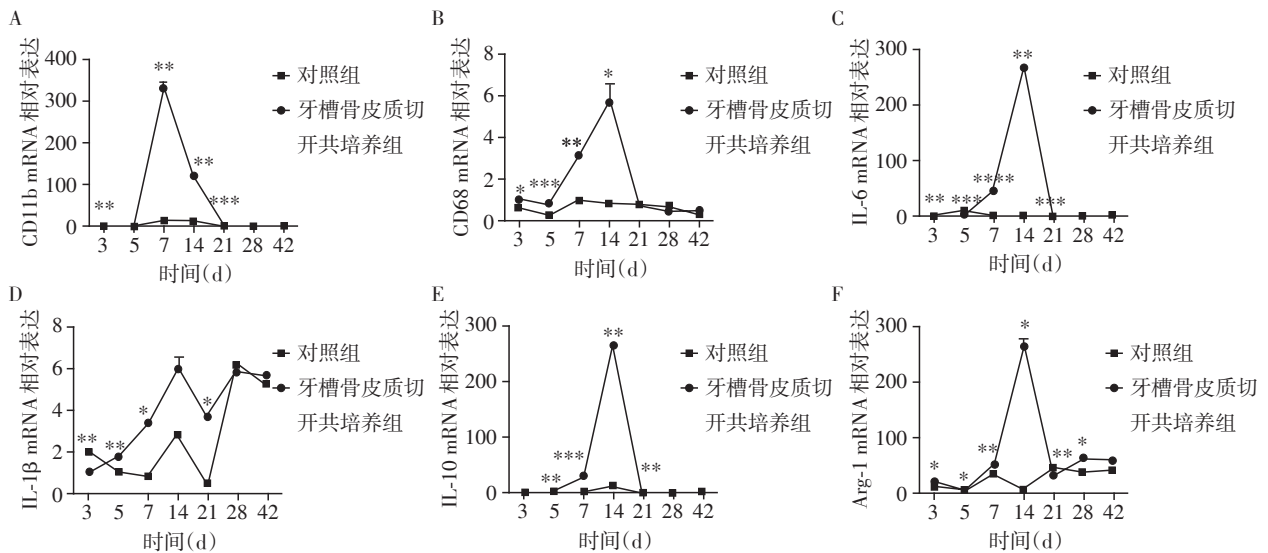
2.5 共培养条件下巨噬细胞中 NF- κ B 及 JAK-STAT 信号通路的表达

为进一步明确牙槽骨皮质切开局部微环境对巨噬细胞极化分型的调控机制,我们分析测定了 NF- κ B 及 JAK-STAT 信号通路在共培养条件下的巨噬细胞中的激活表达情况^[13]。通过 Western blot 对巨噬细胞分析发现,与对照组相比,牙槽骨皮质切开共培养组 p65 蛋白表达量在共培养 5~7 d 时显著增高(图 5A),之后表达量开始降低,21~28 d 期间显著低于对照组。同时,磷酸化的 STAT3 蛋白表达量在 7~14 d 期间显著高于对照组,21 d 后与对照组相比,表达量无显著性差异(图 5B)。



A:左侧上颌第一磨牙远颊根近中压力侧镜下图(×200);B、C:不同细胞表面标记物阳性细胞率比较。与传统正畸组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。
图3 实验第3天牙周组织中CD68、CD11b、CD86、CD163阳性细胞所占比例

Figure 3 CD68, CD11b, CD86 and CD163 positive areas as a percent of the tissues in the dental alveolar bone for the typical subgroup



与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$,**** $P < 0.0001$ 。

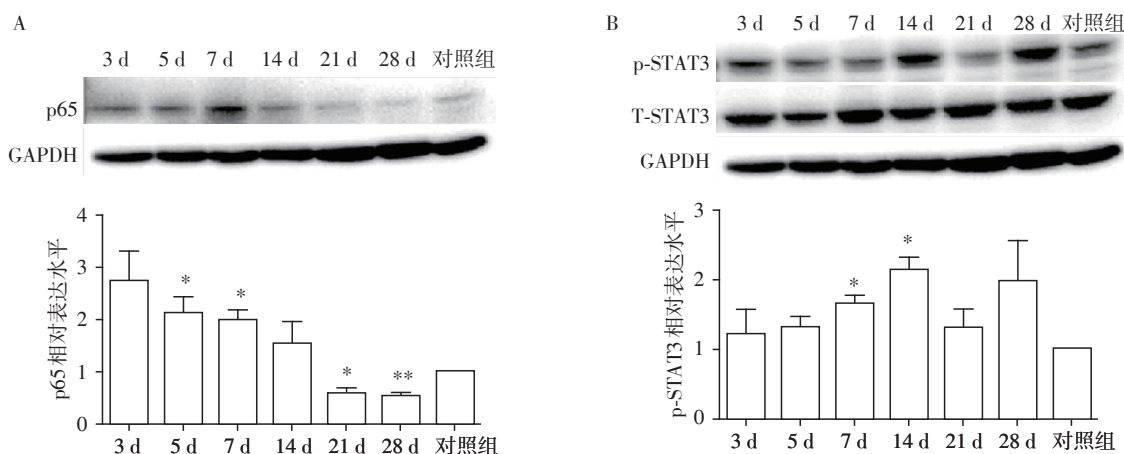
图4 骨组织悬液共培养后巨噬细胞中各因子的表达

Figure 4 The expression of the cytokines in macrophages after co-cultured with the fresh supernatants of the alveolar bone

3 讨论

在过去的10年中,牙槽骨骨皮质切开术已成为加速正畸牙齿移动的热门方法,其机制的研究目前

绝大部分集中在手术诱导的炎症反应过程(包括细胞募集和血管新生)中发挥重要作用的各种细胞因子和生长因子的分泌^[11],而在此过程中,炎性细胞的功能和作用的研究尚不多见,特别是作为在骨形



与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图5 Western blot 法检测骨组织悬液共培养后巨噬细胞中p65(A)及p-STAT3(B)的表达

Figure 5 The expression of p65(A) and p-STAT3(B) in macrophages after co-cultured with the fresh supernatants of the alveolar bone was measured by Western blot

成及生理性骨重塑过程中发挥重要调控作用的巨噬细胞。在本实验中选择大鼠为实验对象,模仿骨皮质切开术,构建简单创伤模型。大鼠因其磨牙结构与人体类似,生命周期短,生命力强,价格低廉,易标准化,因此利于进行大样本研究分析,且大鼠口内可操作空间大,正畸加力模型易建立,所以本实验选择大鼠作为正畸加力模型,同时大鼠模型也是目前公认的正畸牙移动模型动物^[14]。通过Micro-CT扫描,并进行三维重建后测量移动牙周围牙槽骨骨密度,我们发现,尽管骨皮质切开辅助正畸组和传统正畸组的变化趋势表现出相似趋势,但两组之间密度具有统计学差异。表现为传统正畸组近、远中侧骨密度初期少量下降,在14 d后逐渐恢复;而在骨皮质切开辅助正畸组,磨牙近、远中初期同样也表现出骨密度减低,但其降低幅度显著大于传统正畸组,提示骨皮质切开术能够加速骨吸收过程,而在第7天时,骨质破坏区域密度开始增高并有所回升,随后在7~14 d,骨密度又出现明显减低现象,并在远中侧出现谷值,14~21 d逐渐回升。之前的报道也同样发现了类似现象^[15],表现为骨皮质切开辅助正畸组近中侧骨密度在起初大量减少,7~21 d略有恢复,28 d再次显著下降,减少量从牙颈部至根尖部递减。由此推测,术后的7 d内为炎症反应期,7~14 d创伤开始愈合,炎症反应减弱。本研究表明,骨皮质切开术加速正畸的作用主要依赖于对骨密度改变,特别是骨密度降低过程的调控而实现。并且这种调控主要发生在正畸手术的早中期,也提示其手术作用存在时空特异性。免疫组化染色也同样

显示,骨皮质切开后正畸牙移动过程中,在牙齿移动初期,骨皮质切开辅助正畸组和传统正畸组牙周组织均出现明显的CD11b和CD68阳性巨噬细胞浸润,且前者显著高于后者,前者CD86和CD163阳性巨噬细胞浸润也显著高于后者,且CD86阳性细胞率更高。以上研究结果提示骨皮质切开术在导致牙槽骨密度降低的同时可能也诱导了巨噬细胞浸润及极性分化,从而加速正畸牙移动。

众所周知,牙齿移动速度依赖牙周骨重建,骨重建主要依靠破骨细胞和成骨细胞的作用^[9]。而以往研究表明,在正畸过程中压力侧活跃的巨噬细胞数量能够明显增多,表明巨噬细胞数量和牙槽骨骨转化率呈正相关^[10]。研究发现M1型巨噬细胞在正畸力加载第5天和第10天时数量有所增加,并且能够促进牙槽骨吸收和牙移动^[15]。本实验通过将新鲜牙槽骨组织悬液与鼠源腹腔巨噬细胞共培养后分析发现,对牙槽骨进行骨皮质切开术后的局部微环境能够增加巨噬细胞表面标记物的表达,牙槽骨皮质切开共培养组的巨噬细胞标记基因表达水平高于对照组且表达时间较长,表明骨皮质切开术可增加巨噬细胞的表达量并延长其表达时间。同时,我们发现M1型巨噬细胞相关因子IL-6及IL-1 β 以及M2型巨噬细胞相关因子IL-10及Arg-1表达量在初期开始显著高于对照组,7~14 d到达峰值后开始减弱,28 d后表达量与对照组相比无显著性差异,说明骨皮质切开后牙槽骨局部微环境能够对巨噬细胞分型产生作用,表现为M1和M2型巨噬细胞均增多,提示骨皮质切开术加速正畸牙移动过程中,M1

型及M2型巨噬细胞均能够发挥作用,更进一步证实了巨噬细胞能够通过自身极化分型来调控骨密度,加速正畸牙移动。通过分析测定NF- κ B及JAK-STAT信号通路在共培养条件下的巨噬细胞中的激活表达情况,我们发现与对照组相比,牙槽骨皮质切开共培养组p65蛋白以及磷酸化的STAT3表达量在共培养初期开始显著升高,7~14 d期间最为显著,之后表达量开始降低。骨重建主要包括骨吸收及骨修复。有学者研究表明,巨噬细胞中NF- κ B信号通路受体活化因子RANK及其配体RANKL在骨关节炎及骨吸收中扮演重要作用;而JAK-STAT信号通路的激活可以影响巨噬细胞的极化,同时在骨组织修复中也发挥重要作用^[16-17]。结合本研究结果表明,在牙槽骨组织悬液诱导的巨噬细胞分型过程中,NF- κ B及JAK-STAT信号通路的激活可能扮演着重要角色,详细机制有待进一步探究。

本研究首次聚焦正畸驱动的骨皮质切开所诱导的局部微环境变化及其对巨噬细胞产生的生物学作用,初步阐明了牙槽骨皮质切开后局部微环境对巨噬细胞的作用及其可能的机制,为临床治疗提供新的预测及评估指标。未来的研究将进一步明确巨噬细胞在骨皮质切开加速正畸牙移动过程中的作用及调控机制。

[参考文献]

- [1] Richards MR, Fields HW Jr, Beck FM, et al. Contribution of malocclusion and female facial attractiveness to smile esthetics evaluated by eye tracking[J]. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 2015, 147(4):472-482
- [2] Najafi HZ, Oshagh M, Azizi M. Esthetic effect of the buccal corridor size and amount of tooth-gingival display on smile attractiveness in two student population[J]. *J Dent Med*, 2015, 125(24):248-252
- [3] Crielaard W, Zaura E, Schuller AA, et al. Exploring the oral microbiota of children at various developmental stages of their dentition in the relation to their oral health[J]. *BMC Med Genomics*, 2011, 4(1):22
- [4] Machado AW, Macginnis M, Damis L, et al. Spontaneous improvement of gingival recession after correction of tooth positioning[J]. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 2014, 145(6):828-835
- [5] Roscoe MG, Meira JB, Cattaneo PM. Association of orthodontic force system and root resorption: A systematic review[J]. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 2015, 147(5):610-626
- [6] Abbas NH, Sabet NE, Hassan IT. Evaluation of corticotomy-facilitated orthodontics and piezocision in rapid canine retraction[J]. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 2016, 149(4):473-480
- [7] Bahammam MA. Effectiveness of bovine-derived xenograft versus bioactive glass with periodontally accelerated osteogenic orthodontics in adults: a randomized, controlled clinical trial[J]. *BMC Oral Health*, 2016, 16(1):126
- [8] Loi F, Córdova LA, Pajarinen J, et al. Inflammation, fracture and bone repair[J]. *Bone*, 2016, 86(1):119-130
- [9] Gu Q, Yang H, Shi Q. Macrophages and bone inflammation[J]. *J Orthop Translat*, 2017, 10(1):86-93
- [10] 郑红,李静,丁寅. 大鼠正畸牙齿在不同骨转化率下牙周组织变化[J]. *口腔临床医学杂志*, 2012, 28(6):326-328
- [11] Brooks PJ, Heckler AF, Wei K, et al. M-CSF accelerates orthodontic tooth movement by targeting preosteoclasts in mice[J]. *Angle Orthod*, 2011, 81(2):277-283
- [12] He D, Kou X, Yang R, et al. M1-like macrophage polarization promotes orthodontic tooth movement. [J]. *J Dent Res*, 2015, 94(9):1286-1294
- [13] El Kasmi KC, Pugliese SC, Riddle SR, et al. Adventitial fibroblasts induce a distinct pro-inflammatory/pro-fibrotic macrophage phenotype in pulmonary hypertension[J]. *J Immunol*, 2014, 193(2):597-609
- [14] Salomão MF L, Reis SR, Vale VL, et al. Immunolocalization of FGF-2 and VEGF in rat periodontal ligament during experimental tooth movement[J]. *Dental Press J Orthod*, 2014, 19(3):67-74
- [15] 刘畅,栾俐阳,江久汇,等. Micro-CT对骨皮质切开术中区域性加速现象的分析[J]. *口腔医学研究*, 2015, 31(7):641-644
- [16] 阮静瑶,陈必成,张喜乐,等. 巨噬细胞M1/M2极化的信号通路研究进展[J]. *免疫学杂志*, 2015, 31(10):911-917
- [17] Kim J H, Kim N. Signaling Pathways in Osteoclast Differentiation[J]. *Chonnam Med J*, 2016, 52(1):12-17

[收稿日期] 2017-01-03