

# 小鼠正畸牙移动过程中牙周膜 HMGB1 表达变化的研究

冯伟<sup>1,2</sup> 路吉坤<sup>1,2</sup>

1.济南市口腔医院牙体牙髓病1科 山东 济南 250001

2.山东省医药卫生口腔疾病与组织修复重点实验室 山东 济南 250001

**【摘要】**：研究表明，源自牙周膜（PDL）细胞的高迁移率族蛋白 B1（HMGB1）可能是正畸牙齿移动和牙周组织重塑过程中的潜在调节因子。本研究旨在采用 Waldo 法对小鼠磨牙进行持续加力，探究小鼠正畸牙齿移动过程中牙周组织中 HMGB1 的表达情况。实验选用 6 只 7 周龄的 C57BL6 小鼠，将弹性带置于右上颌第一和第二磨牙之间的牙缝中，施加机械力 3 天后，用含 4% 多聚甲醛的 0.1M 磷酸缓冲液（pH7.4）经心脏灌注固定小鼠，然后取出上颌骨进行组织化学分析。组织学检查显示，张力侧出现局部牙周膜撕裂，压迫侧形成广泛的无细胞透明带。HMGB1 的免疫定位在牙周膜张力侧、根尖区和牙髓中显著呈现，而在牙周膜压迫侧，由于透明带的存在，HMGB1 的标记几乎检测不到。综上所述，我们得出结论，采用 Waldo 法进行正畸牙齿移动会导致与螺旋弹簧法不同的组织学变化和 HMGB1 表达模式，包括牙周膜撕裂和广泛的透明带形成，这可能会严重破坏牙周组织，进而阻碍牙齿移动。

**【关键词】**：HMGB1；正畸牙齿移动；牙周组织；Waldo 法

DOI:10.12417/2811-051X.25.09.053

## 引言

高迁移率族蛋白 B1（HMGB1）是一种非染色体核蛋白，通常由坏死细胞释放，同时也作为一种促炎细胞因子参与免疫反应的调节。据报道，HMGB1 在几乎所有真核细胞中都有表达，包括骨细胞，并参与骨化、骨重塑和关节炎的发病机制<sup>[1-2]</sup>。在最近的研究中，人们还发现 HMGB1 在牙周组织（如牙周膜和牙槽骨）中基础表达，并由人牙周膜细胞分泌到细胞外，从而调节各种促炎和破骨细胞生成细胞因子（如 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-17 和 RANKL）的表达，通过这些细胞因子，HMGB1 可以调节这些组织的生物学活性，这表明它在调节这些组织的生物学活性方面具有潜在作用<sup>[3]</sup>。多项临床研究表明，与健康对照组相比，牙周炎患者龈沟液中 HMGB1 水平升高，这表明 HMGB1 在牙周疾病中可能发挥作用<sup>[4-5]</sup>。

正畸治疗伴随的牙周炎、牙髓炎甚至牙根吸收等副作用可能会阻碍牙齿移动，并对治疗效果产生不利影响。已有研究表明，HMGB1 参与了大鼠正畸牙齿移动模型中牙周组织对机械力的炎症反应<sup>[6]</sup>。据我们所知，建立牙齿移动模型的方法主要有以下两种：一种是由 Waldo 和 Rothblatt 在 1954 年描述的方法，即将弹性带置于上颌第一和第二磨牙之间的间隙以产生机械力<sup>[7]</sup>；另一种是随着现代正畸技术的发展而设计的方法，通过将螺旋弹簧固定在上颌第一磨牙和切牙上来诱导第一磨牙向前的机械加载<sup>[8]</sup>。由于初始力总是过大，Waldo 法容易在压迫侧诱导形成无菌性组织坏死，阻碍牙齿移动和牙周组织重塑。最近，Wolf 等人在大鼠牙齿移动模型中，使用第一磨牙和

切牙之间的螺旋弹簧施加机械力后，检测了牙周膜细胞中 HMGB1 的表达模式，发现牙周膜压迫侧和张力侧的 HMGB1 表达具有时间依赖性。但 Waldo 牙齿移动模型中牙周组织的 HMGB1 表达模式是否与螺旋弹簧诱导模型相似仍不清楚。

在本研究中，我们研究了采用 Waldo 法建立的小鼠正畸牙齿移动模型中，牙周膜和牙髓细胞中 HMGB1 表达的变化。此外，我们还研究了两种成骨细胞特异性因子——碱性磷酸酶（ALP）和 Runx2，以探讨 HMGB1 与骨重塑之间的关系。我们假设，机械力和缺氧会调节 HMGB1 的表达，随后该蛋白从细胞核转移到细胞外空间，启动组织重塑和修复。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物和组织制备

本研究中的所有动物实验均按照山东大学动物实验指南进行。从山东大学实验动物中心（中国济南）获得 6 只 7 周龄的 C57BL6 小鼠，平均体重 20g。在小鼠适应环境 1 周后开始实验。采用 Waldo 模型诱导正畸牙齿移动。在麻醉下，将厚度为 0.5mm、宽度为 2mm 的弹性带插入右上颌第一和第二磨牙之间的牙缝中。未处理侧作为对照。施加正畸力 3 天后，所有动物用 8%水合氯醛（400mg/100g 体重）麻醉，并用含 4%多聚甲醛的 0.1M 磷酸缓冲液（pH=7.4）经心脏灌注固定。固定后，取出上颌骨，在相同固定液中再浸泡 24 小时。然后将样本用 10%EDTA-2Na 溶液在 4 $^{\circ}$  C 下脱钙 2 周。之后，样本通过梯度乙醇脱水，并按照标准程序进行石蜡包埋。制备 5 $\mu$ m 厚的连续切片用于后续组织学分析。

## 1.2 HMGB1 的免疫组织化学染色以及 ALP 酶和 TRAP 酶的双重染色

经过二甲苯处理的脱蜡石蜡切片,在室温下用 0.3%过氧化氢预处理 30 分钟。然后用含 1%牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液 (BSA-PBS) 预孵育 20 分钟,以减少非特异性染色。处理后的切片在室温下分别与 Oda 制备的兔抗 ALP 酶血清 (稀释度为 1:150) 或兔抗 HMGB1 抗体孵育 2 小时。然后将切片浸入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗中,在室温下孵育 1 小时。使用二氨基联苯胺显示免疫反应。免疫染色满意后,用 PBS 处理切片,并将其浸入含有 3.0mg 萘酚 AS-BI 磷酸酯、18mg 红紫 LB 盐和 100mM L (+) 酒石酸 (0.36g) 的混合物中,该混合物用 30mL 0.1M 醋酸钠缓冲液 (pH 5.0) 稀释,在 37° C 下孵育 15 分钟。

## 1.3 HMGB1 阳性细胞计数

用光学显微镜观察染色切片并拍摄显微图像。在每个标本的上颌第一磨牙的压迫侧、张力侧、牙髓以及远中根尖区,随机选取相同大小且包含牙周膜组织的图像。借助细胞分析软件 Image Pro Plus 对免疫反应细胞进行计数和计算。由于此类染色结果难以定量,因此未对细胞外免疫反应进行分析。

## 1.4 统计分析

所有统计分析均使用 SPSS 软件进行,所有数据均以平均值±标准差表示。组间差异采用非配对 t 检验评估,当 P<0.01 时认为具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 正畸牙齿移动后牙周组织的组织学变化

上颌第一磨牙向近中移动 3 天后,与对照组相比,张力侧牙周膜宽度因机械力拉伸而增加。值得注意的是,张力侧牙周膜上部出现垂直撕裂。同时,压迫侧牙周膜受到挤压,可见广泛的无细胞透明带,这表明是由过大的压力导致的无菌性坏死。

### 2.2 正畸牙齿移动对成骨细胞和破骨细胞的影响

ALP 和 TRAP 双重染色显示,与对照组相比,牙齿移动组张力侧附着于牙周膜的牙槽骨表面出现许多 TRAP 阳性多核细胞,而由于透明带的存在,压迫侧未观察到破骨细胞 (图 1A、B)。在 ALP 染色方面,两组之间未检测到显著差异 (图 1A、B)。在未经处理的牙周膜两侧,Runx2 的免疫定位呈中度表达 (图 1C),但在施加正畸力后,张力侧该蛋白的表达显著增加 (图 1D)。

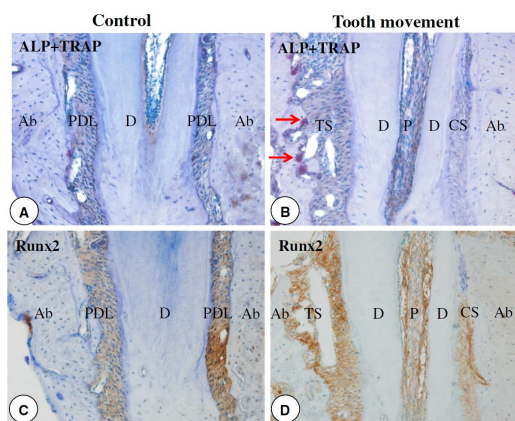


图 1 ALP、TRAP 和 Runx2 的组织化学染色。ALP 和 TRAP 双重染色 (A、B), 以及 Runx2 的免疫定位 (C、D)。PDL: 牙周膜; d: 牙齿; P: 牙髓; Ab: 牙槽骨; TS: 张力侧; CS: 压迫侧。A-D: ×100。

### 2.3 正畸牙齿移动后小鼠牙周膜 HMGB1 的表达

在未处理组中,两侧牙周膜均显示相似的基础 HMGB1 免疫反应性,且免疫染色主要位于细胞核 (图 2A)。正畸牙齿移动后,与对照组相比,根尖区和张力侧牙周膜中 HMGB1 的表达显著增加,分别增加了 4 倍和 2.5 倍 (图 2B、G、J)。然而,由于广泛的无细胞透明带形成,压迫侧的 HMGB1 免疫标记与对照组相比几乎不可见 (图 2B、H)。值得注意的是,正畸牙齿移动后,牙髓细胞中 HMGB1 蛋白的表达也增强, HMGB1 阳性细胞数量比对照组增加了 3 倍 (图 2B、I)。

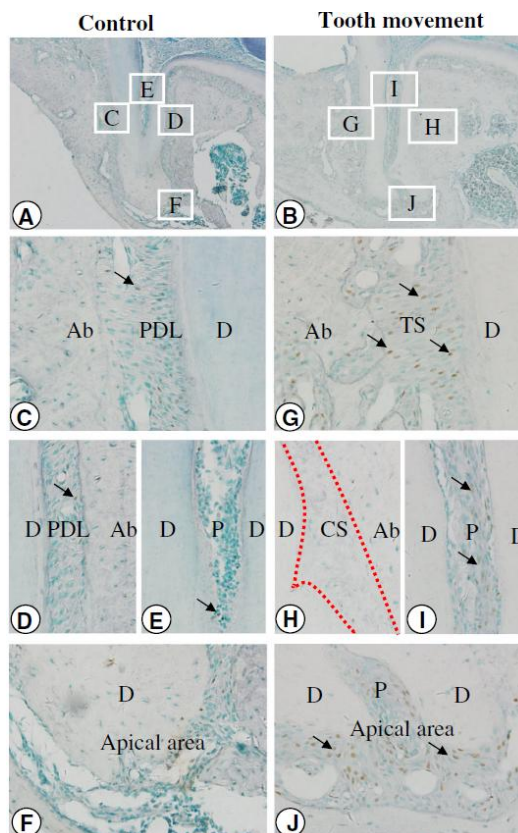


图2 HMGB1 在小鼠牙周膜中的免疫定位。D: 牙齿; P: 牙髓; Ab: 牙槽骨; TS: 张力侧; CS: 压迫侧。A、B:  $\times 40$ ; C-J:  $\times 200$ 。

### 3 讨论

正畸牙齿移动是牙根周围牙槽骨重塑的结果,包括压迫侧的骨吸收和张力侧的骨沉积。在牙齿移动组中,张力侧的骨重塑过程由拉伸的牙周膜激活,许多破骨细胞出现在骨表面,作为旧骨清除者启动后续的骨再生。尽管牙齿移动3天后ALP表达没有显著增加,但成骨的主要调节因子Runx2在张力侧升高,这表明该侧牙槽骨具有很大的成骨潜力<sup>[9-10]</sup>。在张力侧,施加正畸力后牙周膜细胞对HMGB1呈现强免疫标记,这与之前的报道一致<sup>[10]</sup>。然而,该侧也观察到牙周组织破坏,包括牙周膜上部撕裂、附着丧失和严重的牙周炎症,这是由于插入操作或咀嚼过程中弹性带滑入龈沟所致。弹性带在机械损伤牙周膜的同时,还促进了菌斑在局部组织的附着,从而加重了牙周炎症。因此,HMGB1表达的调节归因于施加的力以及局部机械/生物侵袭,在某些情况下甚至可能导致牙齿脱落。

体外研究表明,对人牙周膜细胞施加 $4\text{g}/\text{cm}^2$ 的静态压力8

小时,会诱导HMGB1从细胞核明显转移到细胞质<sup>[10]</sup>。因此,在透明化过程发生之前,HMGB1蛋白的转移很可能在施加力的最初几分钟/几小时内就已经发生。此外,在Wolf的大鼠实验性牙齿移动模型中,螺旋弹簧施加的机械力设定为 $0.5\text{N}$ ,他们报告称在压迫侧形成了无细胞透明带,并且大量受压的牙周膜细胞表达增加的HMGB1。从我们实验的结果来看,Waldo法诱导的透明带范围和面积似乎比螺旋弹簧法大得多。基于此结果,可以假设插入的弹性带施加的机械力大小大于 $0.5\text{N}$ ,至少在初始阶段是这样。但在牙齿移动过程中,弹性带随时间产生的准确力的大小仍有待进一步研究,以便精确评估其对局部牙周组织的影响。

总之,我们的结果表明,与螺旋弹簧法相比,Waldo法诱导的正畸牙齿移动后,牙周组织中HMGB1的表达模式呈现出一些独特的特征,包括在根尖区和牙髓中的额外表达,以及由于透明带的存在,压迫侧的表达无法检测到。此外,加载方式以及挤压弹性带产生的不确定大小的力,导致压迫侧形成明显且广泛的透明带,张力侧牙周膜严重损伤,这可能会阻碍牙齿移动过程,并导致牙髓炎和牙周炎等不良副作用。总体而言,Waldo提出的方法并不是诱导正畸牙齿平稳移动的理想方法。

### 参考文献:

- [1] Andersson U, Harris HE (2010) The role of HMGB1 in the pathogenesis of rheumatic disease. *Biochim Biophys Acta* 1799:141 - 148.
- [2] Yang J, Shah R, Robling AG, Templeton E, Yang H, Tracey KJ, Bidwell JP (2008) HMGB1 is a bone-active cytokine. *J Cell Physiol* 214:730 - 739.
- [3] Kim YS, Lee YM, Park JS, Lee SK, Kim EC (2010) SIRT1 modulates high-mobility group box 1-induced osteoclastogenic cytokines in human periodontal ligament cells. *J Cell Biochem* 111:1310 - 1320.
- [4] Feghali K, Iwasaki K, Tanaka K, Komaki M, Machigashira M, Ishikawa I, Izumi Y (2009) Human gingival fibroblasts release high-mobility group box-1 protein through active and passive pathways. *Oral Microbiol Immunol* 24:292 - 298.
- [5] Morimoto Yet al (2008) Tumor necrosis factor-alpha stimulates gingival epithelial cells to release high mobility-group box 1. *J Periodontal Res* 43:76 - 83.
- [6] Wolf M, Lossdorfer S, Kupper K, Jager A (2013) Regulation of high mobility group box protein 1 expression following mechanical loading by orthodontic forces in vitro and in vivo.
- [7] Waldo CM, Rothblatt JM (1954) Histologic response to tooth movement in the laboratory rat; procedure and preliminary observations. *J Dent Res* 33:481 - 486.
- [8] Ong CK, Walsh LJ, Harbrow D, Taverne AA, Symons AL (2000) Orthodontic tooth movement in the prednisolone-treated rat. *Angle Orthod* 70:118 - 125.
- [9] Fujita T et al (2004) Runx2 induces osteoblast and chondrocyte differentiation and enhances their migration by coupling with PI3K-Akt signaling. *J Cell Biol* 166:85 - 95.
- [10] Hoepfner LH, Secreto F, Jensen ED, Li X, Kahler RA, Westendorf JJ (2009) Runx2 and bone morphogenetic protein 2 regulate the expression of an alternative Lef1 transcript during osteoblast maturation. *J Cell Physiol* 221:480 - 489.