

文章编号:1004-7220(2016)05-0416-05

# 叉头框蛋白 O1 在正畸力介导的牙槽骨改建中的表达改变

代庆刚<sup>a,b</sup>, 张鹏<sup>a</sup>, 周巴入<sup>a</sup>, 房兵<sup>a</sup>, 江凌勇<sup>a</sup>

(上海交通大学医学院附属第九人民医院 a. 口腔颌面科, b. 儿童口腔科, 上海市口腔医学重点实验, 上海 200011)

**摘要:** **目的** 观察大鼠正畸牙移动牙槽骨的改建及叉头框蛋白 O1 (forkhead box O1, FOXO1) 的表达改变, 初步探讨 FOXO1 在正畸力介导的牙槽骨改建中的作用。 **方法** 构建大鼠牙移动模型, 左侧上颌第 1 磨牙在 50 g 力作用下近中移动。分别于牙移动 1、3、7 d 处死大鼠。通过 HE 染色及免疫组织化学法观察牙移动不同时间点第 1 磨牙根分叉区牙槽骨的改建及 FOXO1 的表达水平。 **结果** 正畸力作用后, 大鼠上颌第 1 磨牙不断近中移动。牙移动组根分叉区牙槽骨内破骨细胞较对照组明显增加, 牙移动第 3 d 时破骨活性最强。加载正畸力后, 根分叉区牙槽骨内活跃的成骨细胞逐渐增加, 成骨活性增强; 根分叉区牙槽骨内 FOXO1 主要表达于成骨细胞内, 且随着成骨细胞的增加, FOXO1 的表达逐渐增强。 **结论** 正畸力介导了根分叉区牙槽骨的改建, FOXO1 的表达改变可能与正畸牙移动骨改建相关。

**关键词:** 正畸牙移动; 骨改建; 叉头框蛋白 O1; 成骨细胞; 破骨细胞

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.3871/j.1004-7220.2016.05.416

## The change of FOXO1 expression during alveolar bone remodeling induced by orthodontic force

DAI Qing-gang<sup>a, b</sup>, ZHANG Peng<sup>a</sup>, ZHOU Si-ru<sup>a</sup>, FANG Bing<sup>a</sup>, JIANG Ling-yong<sup>a</sup>

(a. Department of Oral & Cranio-maxillofacial Science, b. Department of Pediatric Dentistry, Shanghai Key Laboratory of Stomatology, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011, China)

**Abstract: Objective** To study the remodeling of alveolar bone and change in expression of forkhead box O1 (FOXO1) during orthodontic tooth movement (OTM) in rat, so as to preliminarily investigate the role of FOXO1 in alveolar bone remodeling induced by orthodontic force. **Methods** The rat OTM models were established and the left maxillary 1<sup>st</sup> molars were moved with force of 50 g. The rats were executed on the 1<sup>st</sup>, 3<sup>rd</sup> and 7<sup>th</sup> day of OTM, respectively. HE staining and immunohistochemical staining were used to observe the remodeling of alveolar bone in the inter-radicular region of the 1<sup>st</sup> molars and expression of FOXO1 at different time points during OTM. **Results** The 1<sup>st</sup> molars were constantly moved mesially under orthodontic force. There were more osteoclasts in the alveolar bone of OTM group than that in non-OTM group, and the osteoclasts on the 3<sup>rd</sup> day of OTM showed the highest activity. The number of active osteoblasts gradually increased in the inter-radicular region of alveolar bone under orthodontic force, with the enhanced osteoblast activity. Expression of FOXO1 in OTM group

收稿日期:2016-07-31; 修回日期:2016-09-04

基金项目:国家自然科学基金项目(81371121, 11342005, 30901698, 10972142, 81570950), 上海市科委资助项目(13ZR1423700, 12JC1405700), 上海交通大学“医工交叉基金”(YG2012MS40), SMC-晨星青年学者奖励计划优秀青年教师(B类计划), 上海高校高峰高原学科建设项目。

通信作者:江凌勇, 副主任医师, E-mail: jly117@sina.com。

was elevated compared with non-OTM group. Most osteoblasts in alveolar bone during OTM were FOXO1 positive, and the expression of FOXO1 was gradually increased with the number of osteoblasts increasing. **Conclusions** Orthodontic force induces bone remodeling of alveolar bone in the inter-radicular region during OTM, and the change in FOXO1 expression may be related to alveolar bone remodeling during OTM.

**Key words:** Orthodontic tooth movement (OTM); Bone remodeling; Forkhead box O1 (FOXO1); Osteoblast; Osteoclast

叉头框蛋白 O (Forkhead box O, FOXO) 是一类高度保守、广泛表达的转录因子, 在细胞的增殖、分化和凋亡中发挥着重要的作用<sup>[1-4]</sup>。FOXO 家族包括 FOXO1、FOXO3、FOXO4、FOXO6 等多个成员。近年研究发现, FOXO1 与骨的发育及改建密切相关, 在维持成骨细胞氧化应激平衡和促进成骨细胞增殖方面发挥着重要作用<sup>[3,5]</sup>。同时, FOXO1 可通过与 Runt 相关转录因子 2 (runt-related transcription factor 2, Runx2) 调节基质干细胞的成骨分化, 参与骨改建<sup>[5-7]</sup>。本课题组前期研究表明, Runx2 在力学介导的骨髓基质干细胞骨向分化过程中发挥重要作用, 并参与正畸牙移动牙槽骨改建<sup>[8-10]</sup>, 然而尚不清楚 FOXO1 是否同样参与正畸力介导的牙槽骨改建。本研究通过建立大鼠正畸牙移动模型, 采用 HE 染色及免疫组织化学方法观察力学作用下牙槽骨改建, 分析 FOXO1 在牙槽骨中的表达变化, 初步探讨 FOXO1 在正畸力介导的牙槽骨改建中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

健康雌性未孕 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 18 只 (体重 180 ~ 200 g), 由上海斯莱克实验动物有限公司提供, 饲养于上海交通大学医学院附属第九人民医院 SPF 级动物房, 许可证号: SYXK (沪) 2012-0007。饲养环境温度 (24 ± 2) °C, 12 h 昼夜更替, 自由饮水及进食, 所有大鼠均在适应性喂养两周后开始实验。本实验对动物的处理方法符合中华人民共和国科学技术部颁发的《关于善待实验动物的指导性意见》。

### 1.2 主要实验仪器及试剂

正畸用镍钛关闭簧, 直径 0.25 mm 结扎丝, 正畸用细丝切断钳, 测力计 (3M Unitek 公司, 美国); 慢速手机 (安华齿科, 中国), 水合氯醛、乙二胺四乙酸 (EDTA), 多聚甲醛 (上海白鹤化工厂); 组织蛋

白酶 K (博士德生物工程公司); 兔抗 FOXO1 一抗 (Cell Signaling 公司, 美国); 辣根过氧化物酶标羊抗兔二抗, 二氨基联苯胺 (DBA) 显色试剂盒 (Dako 公司, 丹麦); 恒温孵育箱 (上海精宏实验设备有限公司); 光学显微镜 (Olympus 公司, 日本)。

### 1.3 方法

**1.3.1 大鼠正畸牙移动模型的建立** 腹腔注射水合氯醛 (400 mg/kg) 麻醉大鼠, 将其仰卧位固定于鼠板。用 0.25 mm 结扎丝将镍钛关闭簧一端结扎于大鼠左侧上颌第 1 磨牙近中。用低速手机在大鼠上颌左侧切牙颈部做一深约 0.5 mm 的固位沟, 并用结扎丝将镍钛关闭簧另一端结扎于固位沟内, 用测力计测量关闭簧产生 50 g 力。用自凝树脂将两个上颌切牙连为一个整体。每天检查装置是否脱落, 如有脱落立刻重新安装。

**1.3.2 标本制备** 分别于牙移动 1、3、7 d 时采用 CO<sub>2</sub> 处死大鼠 6 只。采用电子游标卡尺测量大鼠正畸牙移动距离, 取大鼠上颌第 1 磨牙远中面与第 1 磨牙近中面高点间的距离为牙移动距离。每只大鼠测量两次取平均值, 所有测量由同一操作者完成。取包含上颌左侧磨牙及其周围牙周组织的组织块, 右侧未移动磨牙作为对照组, 去除多余软组织后置于 4% 多聚甲醛中固定 48 h。固定完成后 10% EDTA 脱钙 8 周, 石蜡包埋。按第 1 磨牙水平向连续切片, 层厚 4 μm。选择远中腭根根中 1/3 切片分别进行苏木素-伊红染色 (HE 染色) 和免疫组织化学染色。

**1.3.3 HE 染色** 将切片 100% 二甲苯浸泡 10 min 脱蜡两次, 100%、95%、75% 酒精各 5 min 后流水冲洗 5 min, 苏木素染色 5 min、0.5% 盐酸酒精分化 3 s 后流水冲洗 30 min。伊红染色 30 s 后树脂封片。在每只大鼠第 1 磨牙根分叉区牙槽骨根分叉区牙槽骨随机选取 3 个高倍镜视野计数破骨细胞和成骨细胞。

**1.3.4 FOXO1 免疫组织化学染色** 将切片脱蜡、浸水,0.2%组织蛋白酶 K 37 °C 孵育 20 min。兔抗 FOXO1 一抗 4 °C 孵育过夜。清洗多余一抗后与辣根过氧化物酶标的二抗室温孵育 45 min。洗去多余二抗后 DAB 显色,苏木素复染细胞核。以 PBS 代替一抗作为阴性对照。在每只大鼠第 1 磨牙牙根根分叉区牙槽骨根分叉区牙槽骨随机选取 3 个高倍镜视野计数 FOXO1 阳性细胞数。

**1.3.5 统计学分析** 计量资料均以均数 ± 标准差表示,数据使用统计学软件 SPSS 16.0 采用方差齐性检验,组间比较采用独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 大鼠正畸牙移动**

如图 1(a)所示,大鼠上颌第 1 磨牙在正畸力的作用下不断向近中倾斜移动(图中 M1、M2、M3 标示为第 1、2、3 磨牙,黑线标示出牙移动距离)。正畸加力第 1 d 牙移动速度较快,第 1~3 d 牙移动速度下降,3 d 后牙移动速度再次加快[见图 1(b)]。

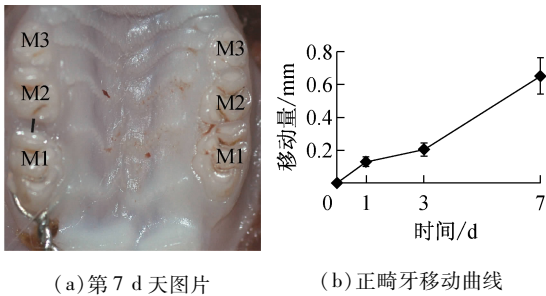


图 1 大鼠正畸牙移动曲线

Fig.1 Orthodontic tooth movement (OTM) curve of rat

(a) Representative maxillary image on the 7<sup>th</sup> day of OTM,  
(b) OTM curve

**2.2 正畸牙移动导致牙槽骨改建增强**

图 2 所示为本研究选取的感兴趣区域,即大鼠上颌第 1 磨牙根 5 个牙根分叉区牙槽骨区域(AB);其中,DB 为远中颊根,DP 为远中腭根,IB 为中间颊根,MB 为近中颊根,MP 为近中腭根。

正畸牙移动牙槽骨 HE 染色结果表明,对照组牙槽骨骨质致密,骨髓腔表面以扁平的衬里细胞为主,可见少量破骨细胞与成骨细胞。牙移动后可见牙槽骨中破骨细胞增加,牙移动 1 d 组牙槽骨中可见多核破骨细胞增加,牙移动 3 d 组见大量活跃破

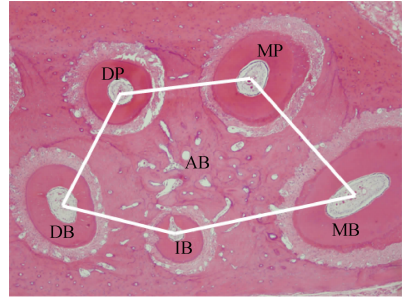


图 2 正畸牙移动牙槽骨感兴趣区域选取

Fig.2 Selection of region of interest in alveolar bone during OTM

骨细胞,牙移动 7 d 组仍可见活跃的破骨细胞[见图 3(a)]。统计分析发现,牙移动第 1、3、7 d,牙槽骨内破骨细胞均较对照组明显增加( $P < 0.05$ ),其中牙移动第 3 d 时破骨细胞数目最多[见图 3(b)]。牙移动第 1 d 组牙槽骨内可见活跃的成骨细胞,牙移动 3 d 组见少量的新骨沉积于骨小梁表面、新骨周围可见立方形的活跃成骨细胞,牙移动 7 d 组骨髓腔表面可见大量新骨沉积,新骨周围可见大量的活跃成骨细胞[见图 3(a)]。统计分析发现,牙移动第 1、3、7 d,牙槽骨内成骨细胞数目均较对照侧增加( $P < 0.05$ );随着牙移动时间延长,成骨细胞数目亦明显增加[见图 3(c)]。以上结果表明,正畸力导致大鼠第 1 磨牙根分叉区牙槽骨改建增强。

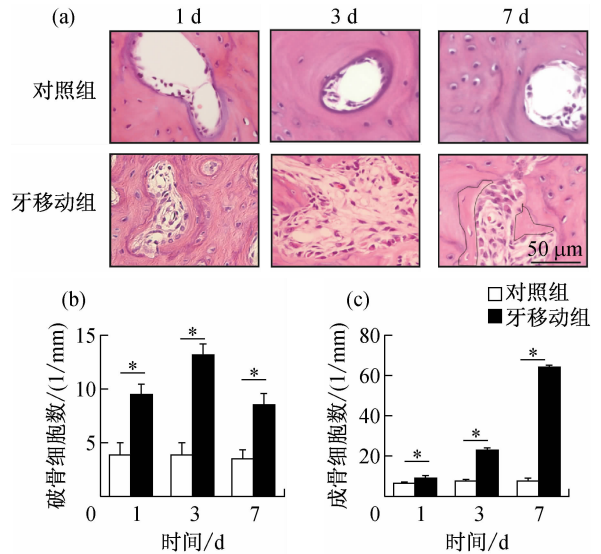


图 3 正畸牙移动牙槽骨 HE 染色结果 (\*  $P < 0.05$ ) (a) 第 1 磨牙根分叉区牙槽骨 HE 染色图片(黑线标识为新骨沉积),(b) 牙槽骨破骨细胞数目,(c) 牙槽骨成骨细胞数目

Fig.3 HE staining of alveolar bone during OTM (a) HE images of alveolar bone in the 1<sup>st</sup> molar, (b) Number of osteoclasts in alveolar bone, (c) Number of osteoblasts in alveolar bone

### 2.3 正畸牙移动牙槽骨 FOXO1 表达增强

对照组牙槽骨 FOXO1 低表达于骨髓腔内;正畸力作用后,FOXO1 表达增加。FOXO1 信号主要集中于成骨细胞内,尤其是活跃的成骨细胞;破骨细胞内 FOXO1 表达较弱。统计分析显示,牙移动 1、3、7 d 组牙槽骨 FOXO1 阳性细胞数均高于对照组 ( $P < 0.05$ ),且随着牙移动时间延长,FOXO1 表达逐渐增加(见图 4)。

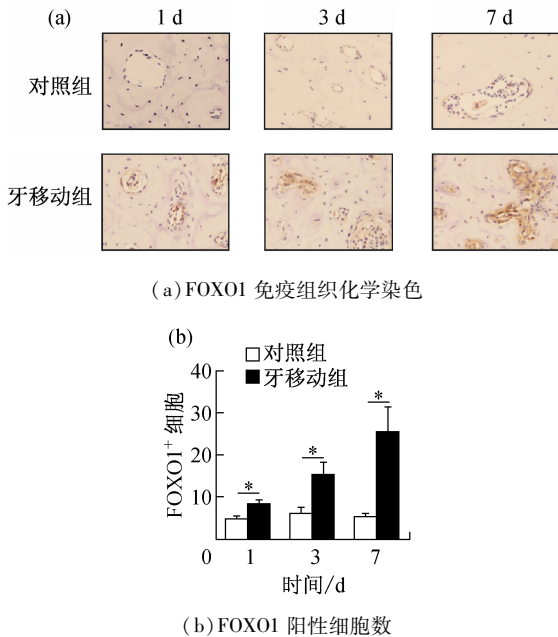


图 4 FOXO1 在正畸牙移动牙槽骨中的表达改变 (\*  $P < 0.05$ )  
Fig. 4 Changes of FOXO1 expression in alveolar bone during OTM  
(a) Immunohistochemical staining of FOXO1, (b) Number of FOXO1 positive cells

### 3 讨论

正畸力通过牙体组织传导到牙周膜及牙槽骨,导致牙周组织发生一系列适应性改建,牙齿随之移动<sup>[11-12]</sup>。本研究为观察正畸力介导的牙槽骨改建,选取大鼠上颌第 1 磨牙根分叉区域作为感兴趣区域。近年来研究表明,FOXO1 在骨改建中发挥着重要作用,然而 FOXO1 是否参与力学介导的牙槽骨改建尚不明了。本研究构建了大鼠正畸牙移动模型,通过组织学方法观察牙移动不同时间点牙槽骨的改建及 FOXO1 表达的改变,初步探讨 FOXO1 在正畸牙移动牙槽骨改建中的作用。

传统理论认为,加载正畸力后牙移动将循序地

经历初始阶、迟缓和迟缓后 3 个阶段<sup>[11,13-14]</sup>。初始阶段牙移动较快,主要是由力学引起的机械变形导致,本研究中为牙移动第 1 d。第 1~3 d,牙移动速度明显减慢,进入迟缓阶段。3 d 以后,牙移动速度加快为迟缓后阶段,又称为线性期。正畸牙移动的基础是牙周组织的改建,尤其是牙槽骨的改建。传统理论认为,在正畸力的作用下形成压力区与张力区。压力区破骨细胞活跃,骨质吸收;张力区成骨细胞活跃,新骨沉积。该理论仅限于牙根周围的牙槽骨改建情况,而多根牙根分叉区牙槽骨的改建并不清楚。然而由于根分叉区牙槽骨较多,此处的骨改建可能才是影响牙移动速度的关键<sup>[15]</sup>。因此,阐明根分叉区牙槽骨的改建不仅能够完善正畸牙移动理论,更能为加速正畸提供理论依据<sup>[16-17]</sup>。

骨改建可分为 3 个阶段:破骨细胞的激活与骨吸收、破骨向成骨逆转以及成骨<sup>[18]</sup>。骨吸收开始于部分分化的破骨前体细胞向骨表面迁移并不断分化、融合形成巨大的多核细胞;第 1 阶段的骨吸收完成后,一些单核细胞出现在骨表面,这些细胞不仅清理骨表面为成骨细胞分泌骨基质创造条件,同时分泌信号分子促进成骨前体细胞的分化与迁移;最后成骨细胞在骨表面沉积新骨直到被吸收的骨完全被新骨替代<sup>[19]</sup>。本研究发现,正畸力作用后,牙槽骨破骨细胞数目增加,牙移动组第 1 d 见少量破骨细胞,3 d 时破骨活性最为显著,7 d 时破骨细胞仍活跃。成骨方面,牙移动组第 1 d 可见活跃的成骨细胞,之后随着牙移动时间延长活跃成骨细胞数明显增加,7 d 组可大量新的骨质沉积,表明牙移动过程中牙槽骨的成骨活性逐渐增强。以上结果说明,在正畸力作用下,大鼠根分叉区牙槽骨有序改建,其改建过程符合骨改建理论<sup>[18]</sup>。

研究表明,FOXO1 与成骨细胞功能及骨的发育与改建密切相关<sup>[6,20]</sup>。FOXO1 敲除小鼠胚胎表达导致小鼠骨骼系统发育异常<sup>[8]</sup>。成骨诱导间充质干细胞时,FOXO1 表达与活性均增强<sup>[21]</sup>。沉默 FOXO1 使得间充质干细胞成骨标志物 Runx2、碱性磷酸酶、骨钙素的表达降低,抑制其骨向分化。相反,过表达 FOXO1 可促进间充质干细胞骨向分化。FOXO1 与 Runx2 在某种程度上共同合作调节成骨细胞的分化与功能。研究表明 FOXO1 可直接与 Runx2 启动子结合,调控 Runx2 表达进而影响骨改

建<sup>[7]</sup>。本课题组前期研究表明,Runx2 在力学介导的骨髓基质干细胞骨向分化及正畸牙移动牙槽骨改建中均有重要作用<sup>[8-10]</sup>。因此,本文推测 FOXO1 可能同样参与正畸力介导的牙槽骨改建。本研究显示,牙移动前 FOXO1 在牙槽骨中的表达低,随着时间延长,FOXO1 表达逐渐升高。FOXO1 主要表达于成骨细胞内,其表达的升高与牙槽骨中活跃成骨细胞数目增加相关,表明 FOXO1 的表达变化可能与正畸牙移动牙槽骨改建相关。

正畸牙移动牙槽骨的改建是一个力学介导的复杂生物学过程,牵涉多种细胞共同协作,其具体机制尚不十分明确。本研究构建了大鼠正畸牙移动模型,通过组织学观察发现,牙移动过程中根分叉区牙槽骨 FOXO1 表达明显升高,并且与活牙槽骨改建增强密切相关,提示 FOXO1 可能参与了正畸牙移动骨改建。然而,本研究仅从组织学方面观察了 FOXO1 在正畸力介导的牙槽骨改建中的表达变化,FOXO1 在力学介导的骨改建中的作用尚需进一步探讨。

#### 参考文献:

- [1] GREER EL, BRUNET A. FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression [J]. *Oncogene*, 2005, 24(50): 7410-7425.
- [2] ACCILI D, ARDEN KC. FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation [J]. *Cell*, 2004, 117(4): 421-426.
- [3] YANG S, XU H, YU S, *et al.* Foxo1 mediates insulin-like growth factor 1 (IGF1)/insulin regulation of osteocalcin expression by antagonizing Runx2 in osteoblasts [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(21): 19149-19158.
- [4] IYER S, AMBROGINI E, BARTELL SM, *et al.* FOXOs attenuate bone formation by suppressing Wnt signaling [J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(8): 3409-3419.
- [5] RACHED MT, KODE A, SILVA BC, *et al.* FoxO1 expression in osteoblasts regulates glucose homeostasis through regulation of osteocalcin in mice [J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(1): 357-368.
- [6] TEIXEIRA CC, LIU Y, THANT LM, *et al.* Foxo1, a novel regulator of osteoblast differentiation and skeletogenesis [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(40): 31055-31065.
- [7] SIQUEIRA MF, FLOWERS S, BHATTACHARYA R, *et al.* FOXO1 modulates osteoblast differentiation [J]. *Bone*, 2011, 48(5): 1043-1051.
- [8] ZHANG P, DAI Q, OUYANG N, *et al.* Mechanical strain promotes osteogenesis of bmscs from ovariectomized rats via the ERK1/2 but not p38 or JNK-MAPK signaling pathways [J]. *Curr Mol Med*, 2015, 15(8): 780-789.
- [9] 代庆刚, 江凌勇, 张鹏, 等. 成骨特异转录因子 Runx2 在去势大鼠正畸牙移动牙周组织中的表达 [J]. *中华老年口腔医学杂志*, 2014, 12(1): 1-6.
- [10] ZHANG P, WU Y, JIANG Z, *et al.* Osteogenic response of mesenchymal stem cells to continuous mechanical strain is dependent on ERK1/2-Runx2 signaling [J]. *Inter J Mol Med*, 2012, 29(6): 1083-1089.
- [11] PERSSON M. A 100th anniversary: Sandstedt's experiments on tissue changes during tooth movement [J]. *J Orthod*, 2005, 32(1): 27-28.
- [12] 赵志河, 李宇. 正畸牙移动细胞生物力学研究进展 [J]. *医用生物力学*, 2010, 25(6): 393-398.
- [13] ZHAO ZH, LI Y. Advances in cytomechanics in orthodontic tooth movement [J]. *J Med Biomech*, 2010, 25(6): 393-398.
- [14] KRISHNAN V, DAVIDOVITCH Z. Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force [J]. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 2006, 129(4): 469 e1-32.
- [15] MEIKLE MC. The tissue, cellular, and molecular regulation of orthodontic tooth movement: 100 years after Carl Sandstedt [J]. *Euro J Orthod*, 2006, 28(3): 221-240.
- [16] DAI QG, ZHANG P, WU YQ, *et al.* Ovariectomy induces osteoporosis in the maxillary alveolar bone: An in vivo micro-CT and histomorphometric analysis in rats [J]. *Oral Dis*, 2014, 20(5): 514-520.
- [17] HUANG H, WILLIAMS RC, KYRKANIDE S. Accelerated orthodontic tooth movement: Molecular mechanisms [J]. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 2014, 146(5): 620-632.
- [18] BALOUL SS. Osteoclastogenesis and osteogenesis during tooth movement [J]. *Front Oral Biol*, 2016, 18: 75-79.
- [19] HADJIDAKIS DJ, ANDROULAKIS II. Bone remodeling [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2006, 1092: 385-396.
- [20] BOYLE WJ, SIMONET WS, LACEY DL. Osteoclast differentiation and activation [J]. *Nature*, 2003, 423(6937): 337-342.
- [21] TAN P, GUAN H, XIE L, *et al.* FOXO1 inhibits osteoclastogenesis partially by antagonizing MYC [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 16835.
- [22] 欧阳宁鹏, 张鹏, 傅润卿, 等. FoxO1 在持续张应力促 MC3T3-E1 细胞成骨向分化中的表达变化 [J]. *医用生物力学*, 2015, 30(2): 154-158.
- [23] OUYANG NJ, ZHANG P, FU RQ, *et al.* Changes in FoxO1 expression of MC3T3-E1 cells during continuous tensile stress induced osteogenic differentiation [J]. *J Med Biomech*, 2015, 30(2): 154-158.