论著

文章编号:1000-5404(2010)04-0324-03

# 模拟高原缺氧对慢性牙周炎大鼠血清中 MMP-2 表达的影响

孔 耀[1],刘鲁川[1],周 霞[1],刘福玉[2],杨苏平[1],张海元[1] (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所口腔科[1];400038 重庆,第三军医大学高原军事医学系病理生理学与高原生理学教研室,高原医学教育部重点实验室,全军高原生理与高原病研究重点实验室[2])

**[摘要]** **目的** 研究常氧与缺氧条件下慢性牙周炎大鼠血清中基质金属蛋白酶2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)的表达变化,探讨 MMP-2 与高原牙周病的关系。**方法** 模拟高原缺氧建立大鼠慢性牙周炎模型,采用 ELISA 法测定正常对照组、常氧牙周炎组、缺氧对照组、缺氧牙周炎组大鼠血清中 MMP-2 表达。**结果** 正常对照组、常氧牙周炎组、缺氧对照组、缺氧牙周炎组血清中 MMP-2 浓度分别为(92.00±21.78)、(118.09±25.01)、(102.03±21.30)、(159.19±34.13) ng/ml,常氧牙周炎组与正常对照组、缺氧牙周炎组与缺氧对照组、缺氧对照组与正常对照组、缺氧牙周炎组与常氧牙周炎组比较均有统计学意义($P<0.01$)。其中缺氧牙周炎组血清中 MMP-2 浓度升高最为显著($P<0.01$)。**结论** 缺氧上调血清中 MMP-2 的表达,进而促进大鼠牙周组织的破坏。

**[关键词]** 缺氧;基质金属蛋白酶2;血清;牙周炎;大鼠

**[中图法分类号]** R339.54;R446.112;R781.4 **[文献标志码]** A

# Effect of simulated high altitude hypoxia on matrix metalloproteinase-2 expression in serum of rats with chronic periodontitis

Kong Yao[1], Liu Luchuan[1], Zhou Xia[1], Liu Fuyu[2], Yang Suping[1], Zhang Haiyuan[1] ([1]Department of Stomatology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042; [2]College of High Altitude Military Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the change of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) expression in serum of rats with chronic periodontitis under normal oxygen or hypoxia conditions and the correlation between MMP-2 and high altitude periodontitis. **Methods** A chronic periodontitis model of rat was established by simulating high altitude hypoxia. Rats were divided into normal control (NC) group, normal oxygen periodontitis group ($P_1$), hypoxia control group(H), and hypoxia periodontitis group ($P_2$). Expression of MMP-2 in serum of rats was detected by ELISA. **Results** The MMP-2 level in N, $P_1$, H, and $P_2$ groups was 92.00±21.78, 118.09±25.01, 102.03±21.30, and 159.19±34.13 ng/ml, respectively ($P<0.01$). The serum MMP-2 level was significantly higher in $P_2$ group than in other groups. **Conclusion** Hypoxia up-regulates MMP 2 expression in serum and promotes destruction of periodontal tissue in rats, suggesting that MMP-2 participates in destruction of periodontal tissue during hypoxia periodontitis, which may be related with the recurrence and development of high altitude periodontal diseases.

**[Key words]** anoxia; matrix metalloproteinase2; serum; periodontitis; rats

Supported by General Program of the "Eleventh Five-Plan" for Medical Science Development of PLA (06MB252). Corresponding author: Liu Luchuan, Tel: 86-23-68757576

细胞外基质(extracellular matrix, ECM)代谢失衡是引起牙周病的重要原因之一。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)为一种蛋白水解酶,能降解诸如胶原、蛋白聚糖等细胞外基质成分,直接参与牙周组织的破坏降解过程,在牙周病的发生、发展过程中起着重要作用。高原缺氧是引起牙周病的另一个重要因素。流行病学调查显示,久居于高原者,牙周病的发病率较高或原有的牙周病病变进展加速[1]。目前关于牙周病中 MMPs 表达的研究多集中于 MMPs 在大鼠牙龈组织和龈沟液中的表达,而在大鼠血清中的表达报道少见。本研究通过模拟高原缺氧,建立大鼠慢性牙周炎模型,检测大鼠血清中 MMP-2 表达变化,探讨 MMP-2 在高原牙周病发病机制中的作用。

**[基金项目]** 全军医学科研"十一五"计划面上项目(06MB252)

**[通信作者]** 刘鲁川,电话:(023)68757576

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

健康清洁级 Sprague-Dawley 大鼠 40 只(第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供);MMP-2 ELISA 试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司);牙龈卟啉单胞菌、具核梭杆菌和中间普氏菌(宝洁公司研究发展部);低压舱(第三军医大学高原军事医学系);酶标仪(Bio-Rad Model 550)。

### 1.2 牙周炎动物模型的建立

健康清洁级 Sprague-Dawley 大鼠雌雄各半,共 40 只,体质量(200±10) g,3 d 适应性(雌雄分笼)饲养及光照节律正常后,随机数字法分为 4 组,即正常对照组(N)、常氧牙周炎组(P1)、缺氧对照组(H)、缺氧牙周炎组(P2)。正常对照组不做任何处理,正常饲养。常氧牙周炎组在本地常规实验室(重庆市,海拔高度为 308 m)内进行饲养。参照 Fischer 等方法复制牙周炎动物模型。3% 戊巴比妥纳(40 mg/kg)经腹腔注射麻醉,待大鼠进入麻醉状态后,取其后仰卧位,四肢和头部固定于手术台上。使用正畸 0.20 号结扎丝结扎右上颌第一磨牙牙颈部,隔日于大鼠股四头肌注射醋酸强的松龙 1.25 mg/kg,1 次/日,连续3 d。实验 5 d,口腔接种病原菌 1 次,即牙龈卟啉单胞菌、中间普氏菌和具核梭杆菌,比例为 2∶1∶1的混合菌液,每只大鼠0.1 ml,共接种 3 次。在 15 d 同法麻醉,对建模大鼠进行复查,使结扎丝尽可能进入牙周袋内。按照牙周炎的食谱喂食。缺氧牙周炎组进入低压舱模拟海拔高度为 5 000 m 的环境,每天缺氧时间为 23 h,其他实验方法和常氧牙周炎组相同。缺氧对照组常规饮水和饲料喂养进入低压舱模拟海拔高度为 5 000 m 的环境,每天缺氧时间为 23 h,不加其他任何干预因素。造模过程中缺氧对照组死亡 1 只实验大鼠,缺氧牙周炎组死亡 2 只实验大鼠。

造模 8 周后拆除实验牙牙颈部结扎丝,解剖取出上颌骨,保留磨牙区骨段,4% 多聚甲醛固定,6% 硝酸脱钙,脱水,包埋,切片,常规 HE 染色,光学显微镜下观察。

### 1.3 大鼠血清 MMP-2 浓度测定

1.3.1 标本采集 造模 8 周后,各组大鼠空腹状态下抽取下腔静脉血 2 ml,室温下静置 1 h 后,3 000 r/min,离心 10 min ,分离血清,置于 -20 ℃保存待测定。

1.3.2 测定方法 运用 ELISA 法检测待测血清中 MMP-2 浓度。浓度单位分别为 ng/ml,所有检测均采用复孔检测。由于唾液及汗液中含有 MMP-2,故实验时配戴口罩和手套。按试剂盒说明书进行,最终反应板在 Bio-Rad Model 550 型酶标测定仪上测定。以标准品 MMP-2 抗原系列浓度值为 X 轴,及其相应的 $D$(450 nm)吸光值为 Y 轴,建立标准曲线 $Y = 0.000\ 3X + 0.043\ 9$($R^2 = 0.995\ 7$),各个样品的浓度即可由标准曲线获得。

### 1.4 统计分析

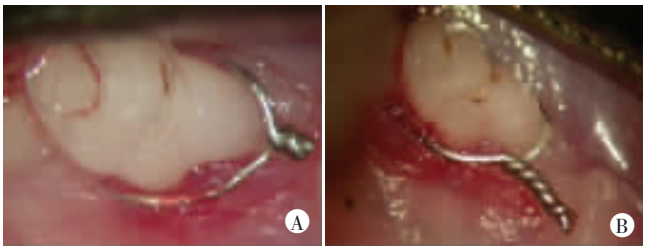
采用 SPSS 13.0 软件处理数据。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用双因素方差分析。

## 2 结果

### 2.1 体视显微镜及组织病理学结果

造模 8 周后实验大鼠牙周组织糜烂、萎缩,实验选用牙周围有大量食糜,牙龈触之出血或有自发性出血、溢脓现象(图 1)。

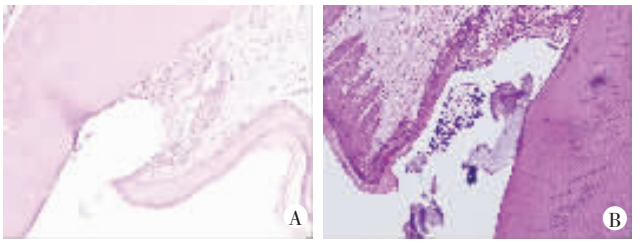
造模 8 周后实验大鼠牙周组织 HE 染色显示正常对照组和缺氧对照组结合上皮无病理性改变,牙周膜纤维排列整齐,细胞排列有序,牙槽嵴无吸收,牙槽骨无破坏。牙龈上皮、龈沟上皮基本完整,牙龈纤维排列整齐,固有层有少量中性粒细胞浸润。




A:常氧牙周炎组;B:缺氧牙周炎组

**图 1 造模 8 周大鼠牙周体视显微镜观察** (×32)

常氧牙周炎组沟内上皮出现糜烂,向结缔组织内增生呈网眼状,可见大量炎症细胞如中性粒细胞、淋巴细胞。牙周膜间隙增宽,结构疏松,纤维、细胞排列杂乱无序。缺氧牙周炎组沟内上皮网状变性,胶原纤维水肿、变性、丧失,有大量中性粒细胞、淋巴细胞浸润,并见一部分中性粒细胞及渗出物移出至牙周袋。牙周间隙明显增宽,牙周膜纤维排列紊乱或断裂(图 2)。




A:常氧牙周炎组;B:缺氧牙周炎组

**图 2 造模 8 周大鼠牙周组织病理学观察** (HE ×200)

### 2.2 大鼠血清 MMP-2 浓度比较

常氧牙周炎组与正常对照组、缺氧牙周炎组与缺氧对照组、缺氧对照组与正常对照组、缺氧牙周炎组与常氧牙周炎组组比较均有统计学意义($P < 0.01$)。其中 $P_2$ 组血清中 MMP-2 浓度升高最为显著($P < 0.01$)(表 1)。

**表 1 4 组大鼠血清中 MMP-2 的比较** (ng/ml, $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | $n$ | MMP-2(ng/ml) |
|---|---|---|
| 正常对照组 | 10 | 92.00±21.78 |
| 常氧牙周炎组 | 10 | 118.09±25.01[a] |
| 缺氧对照组 | 9 | 102.03±21.30[a] |
| 缺氧牙周炎组 | 8 | 159.19±34.13[bc] |

a: $P < 0.01$, 与 N 组比较;b: $P < 0.01$, 与 $P_1$ 组比较;c: $P < 0.01$, 与 H 组比较

## 3 讨论

牙周病的发生、发展过程,是细菌、宿主、环境之间相互作用的结果。虽然细菌及代谢产物是牙周病发生的必要条件,但缺氧作为牙周病的促进因素,也成为了近年来关注的焦点。高原缺氧、低温、强辐射等环境下可引起机能一系列的病理生理反应,直接影响组织细

胞的代谢,使机体发生一系列复杂的适应性或代偿性的生理变化,其中缺氧是主要的影响因素。牙周组织对缺氧敏感,在缺氧环境下,高原血液流变学呈现"浓、黏、聚、凝"的特点[2],机体血液黏滞度增高,微循环中血流缓慢甚至停滞,牙周供氧减少,牙周组织防御力、抗细菌能力及修复功能下降[3]。此外,牙周组织供氧不足和代谢废物堆积,使牙周氧化还原电势下降,有利于厌氧菌的生存[4]。因此高原缺氧对牙周组织的危害是一个多方面的、复杂的过程。

在牙周病的致病因素中有一组酶家族,即基质金属蛋白酶,其在引起牙周组织降解破坏方面起着重要作用,被认为是牙周组织破坏的主要侵袭者。有文献报道,牙周炎患者活检标本中可检测到 MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-8、MMP-9[5]。Ma[6]等用多克隆抗体,借助亲和细胞化学技术在牙周炎患者结合上皮的结缔组织中检测到被胶原酶水解的典型的3/4、1/4 胶原片段,以此证明了胶原酶存在于牙周炎患者结合上皮的结缔组织中,且与对照组之间有显著性差异。可见宿主细胞来源的胶原酶参与牙周组织的降解、附着丧失。MMP-2 即明胶酶 A,是参与结缔组织降解,组织再构筑的关键酶。主要作用于细胞外基质和基底膜中的Ⅳ型胶原。研究表明,慢性牙周炎患者龈沟液、牙龈组织、唾液样本中均可发现有活性的 MMP-2 表达呈病理性升高[7]。本实验则从血清中 MMP-2 表达探讨其在高原牙周病中的作用。本研究结果显示:缺氧和牙周炎血清中 MMP-2 表达都较正常组增加,缺氧牙周炎组血清中 MMP-2 表达与缺氧对照组和常氧牙周炎组有显著性差异($P<0.01$)。说明血清中 MMP-2 表达的增加与缺氧引起的牙周病有密切的关系。

缺氧对 MMP-2 的表达调控可能是一个多水平的调节。在转录水平上,MMPs 的表达受到转录因子、生长因子、细胞因子、化学增活素等多方面的调节[8]。MMPs 的启动子区域含有 NF-kB、AP-1、SP1 等转录因子的结合位点,缺氧可能导致这些转录因子结合于启动子区域时影响启动子的活性,从而对启动 MMPs 基因转录产生影响[9]。在转录后水平上,MMPs 的表达可能受到 mRNA 稳定性调节[8]。在缺氧条件下,可通过改变 mRNA 稳定性影响 MMP-2 的表达。在蛋白的合成、分泌与活化方面,MMP-2 还受到膜型基质金属蛋白酶(MT1-MMP)和基质金属蛋白酶组织抑制因子-2(tissue inhibitors of MMP-2,TIMP-2)的调节。这两种蛋白对缺氧敏感,Ben-Yosef 等[10]研究证实在人 EA-hy926 细胞缺氧 24 h MT1-MMP 受抑制后,MMP-2 的分泌与活化也受到抑制。此外,MMP-2 与 TIMP-2 是两个作用相反的家族,在牙周组织中维持一种平衡统一的状态,TIMP-2 可与 MMP-2 形成复合物抑制其蛋白水解活性。一旦有各种致病因子打破这种平衡,将导致牙周病的发生、发展。有研究表明缺氧可导致肝星状细胞 TGF-$\beta_1$ 基因表达增强,抑制 TIMP-2 的表达,增加 MMP-2 的表达,导致细胞外基质过多的降解[11]。综上所述,缺氧对 MMP-2 的调节可能涉及基因转录、mRNA 稳定性、酶原分泌、基质金属蛋白酶组织抑制因子等水平上的精密调控,其具体机制有待进一步研究。本研究探讨了血清中 MMP-2 表达的变化,实验结果提示 MMP-2 可能与缺氧引起的牙周病有关,MMP-2 血清水平可作为诊断高原牙周病的临床参考。本研究提示,与提取患者的牙龈组织和龈沟液进行检测相比,血清检测不会对患者的患病部位造成两次损伤,不会因采集龈沟液标本时因炎症出血导致标本受到污染而影响检测的准确度。因此,抽取血清进行高原牙周病相关指标的检测是一种比较方便、快捷、可行性高的方法,具有一定的临床意义。

## 参考文献:


[1] 冯秀娟. 高海拔地区牙周疾病就诊原因分析[J]. 高原医学杂志, 2002, 12(2): 26.

[2] 高钰琪. 高原军事医学[M]. 重庆: 重庆出版社, 2005: 6-8.

[3] 朱鹰. 高海拔地区慢性阻塞性肺气肿、肺心病与牙周病关系[J]. 高原医学杂志, 2002, 12(4): 44-45.

[4] 冯秀娟. 西宁地区老年口腔门诊1000例分析[J]. 高原医学杂志, 2007, 17(4): 38-39.

[5] Tsuruga E, Irie K, Yajima T. Fibrillin-2 degradation by matrix metalloproteinase-2 in periodontium[J]. J Dent Res, 2007, 86(4): 352-356.

[6] Ma J, Sorsa T, Billinghurst C R, *et al*. Direct evidence of collagenolysis in chronic periodontitis[J]. J Periodontal Res, 2003, 38(6): 564-567.

[7] Marques M R, Dos-Santos M C L G, da-Silva A F, *et al*. Parathyroid hormone administration may modulate periodontal tissue levels of interleukin-6, matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in experimental periodontitis[J]. J Periodontal Res, 2009, 44(6): 744-750.

[8] Clark I M, Swingler T E, Sampieri C L, *et al*. The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2008, 40(6/7): 1362-1378.

[9] Takahra T, Smart D E, Oakley F, *et al*. Induction of myofibroblast MMP-9 transcription in three-dimensional collagen I gel cultures: regulation by NF-kappaB, AP-1 and Sp1[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2004, 36(2): 353-363.

[10] Ben-Yosef Y, Lahat N, Shapiro S, *et al*. Regulation of endothelial matrix metalloproteinase-2 by hypoxia/reoxygenation[J]. Circ Res, 2002, 90(7): 784-791.

[11] Poli G, Parola M. Oxidative damage and fibrogenesis[J]. Free Radic Biol Med, 1997, 22(1-2): 287-305.


(**收稿**:2009-07-08;**修回**:2009-07-28)

(编辑 邓强庭)