基础研究 文章编号:0253-3626(2009)08-1004-04

人牙髓中基质金属蛋白酶-9受正畸力作用影响的初步分析

刘 鑫[1],向学熔[2],范小平[3],杨光玉[1],李亚奇[3]

(1.重庆市第三人民医院口腔科,重庆 400014;2.重庆医科大学附属口腔医院牙周黏膜科,重庆 400015;3.重庆医科大学附属口腔医院正畸科,重庆 400015)

【摘 要】目的:采用免疫组织化学方法,研究接受正畸力作用影响的人牙髓中基质金属蛋白酶-9(Matrix metalloproteinase-9,MMP-9的表达。方法:选取接受正畸治疗的患者10名,于正畸治疗前确定应拔除的正畸牙,对其一侧选用常规正畸加力,另一侧健康同名牙不施加任何正畸力,作为同源对照,加力1d后至7d内拔除该正畸牙,各20颗,共40颗,分为加力组和对照组;选取临床诊断有牙髓炎症且无保留价值的第3磨牙20例,分为炎症组;对标本进行处理后制成切片,采用SP法,对其中MMP-9的表达进行图像分析和半定量分析。结果:对照组、加力组和炎症组牙髓均可见MMP-9的表达;在接受正畸力的牙髓组织,成牙本质细胞和牙髓成纤维细胞可见MMP-9表达,加力组牙髓中MMP-9为表达增强,并且两者表达强于同源对照正常的牙髓,但弱于炎症牙髓,3组差异具有统计学意义($P<0.05$)。结论:MMP-9在人牙髓中主要表达于成牙本质细胞和牙髓成纤维细胞的胞质中;生理条件下MMP-9的水平较低,在接受正畸治疗时,由于受正畸力影响,牙髓处于应激状态,MMP-9表达增强,应引起口腔医师的高度重视。

【关键词】基质金属蛋白酶;牙髓;免疫组织化学;牙髓炎;正畸

【中国图书分类法分类号】R781.05 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-10-08

The expression of MMP-9 in human dental pulps under orthodontic forces: an immunohistochemical study

LIU Xin, et al

(*Department of Stomatology, the Third People's Hospital of Chongqing*)

【Abstract】*Objective*: To Study the expressions of Matrix metalloproteinase-9(MMP-9)in human dental pulps in patients under the effects of orthodontic forces. *Methods*: 10 orthodontic patients were selected, the orthodontic teeth to be extracted were decided before orthodontic treatments had started. One side of the orthoodontic tooth underwent routine orthodontic forces. The teeth were extracted within 1 to 7 days after orthodontic forces had been used. There were 20 teeth as under-forces group. The other side of the pre-extracted teeth did not receive any orthodontic forces.There are also 20 teeth as homologized control group. 20 third molares clinically diagnosed with endodontitis and without worth of remaining were as inflamed group.Iimmunohistochemical streptavidin peroxidase method (SP method) was used.The expression of MMP-9 was analyzed by analysing images and half-quantitative analysis. *Results*: There was expression of MMP-9 in control, under- forces and inflamed groups.In under-forces pulpal tissues, MMP-9 was mainly expressed in odontoblasts and fibroblasts.In under- forces pulps, the expression of MMP-9 was manifestly stronger than that of controls, but weaker than that of the inflamed one. The differences among the three groups had statistical significance ($P<0.05$). *Conclusions*: MMP-9 is mainly expressed in cytoplasts of odontoblasts and fibroblasts in human dental pulps.In physiological conditions, the expression level of MMP-9 is low.During orthodontic treatments, effected by the orthodontic forces, the dental pulps are in stringent state. The expression of MMP-9 is strengthened which should arouse the attention of the dentists.

【Key words】Matrix metalloproteinases; Dental pulp; Immunohistochemistry; Pulpitis; Orthodontics

牙髓中细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)是由牙髓成纤维细胞和成牙本质细胞等合成并分泌到细胞外的生物大分子所构成的网络状物质,分布于细胞之间或细胞表面,其化学成分的动态变化是一个窗口,通过它可以窥测牙髓细胞的代谢活性

作者介绍:刘 鑫(1981-),男,主治医师,硕士,研究方向:牙体牙髓病,牙周病、口腔黏膜病和正畸力与牙髓应激状态相关性研究的临床及基础性研究。

通讯作者:范小平,男,副教授,E-mail: cqzxfxp@sina.com。

基金项目:重庆市卫生局科研资助项目(07-2-175)。

和功能[1]。基质金属蛋白酶(Matrix metalloproteinases,MMPs)在牙髓组织 ECM 代谢过程中发挥着关键性作用,是牙髓病过程中组织损伤机制中的重要因子,其基因表达、蛋白质合成以及活性的表达受到多种因素的调节,对 MMPs 的研究可以为牙髓病的治疗提供新思路[2]。正畸力适宜时,牙髓组织并不出现显著的牙髓炎症改变,但可以引起牙髓血流量减少,一些牙髓中神经递质、酶、细胞因子表达改变[3]。对正畸力作用下牙髓中 MMPs 的活性及表达的研究目前依然比较少。本文就人牙髓中MMP-9 在正畸力作用影响下的表达进行免疫组化研究。

1 材料与方法

1.1 材料

收集重庆医科大学附属口腔医院口腔外科门诊拔牙病例,通过以下临床检查确定牙髓健康状况:冷诊、热诊、电活力、疼痛史、牙周探诊及叩诊。其中,接受正畸治疗的患者 10 名(男女各 5 名),告知详情,获得同意,于正畸治疗前确定应拔除的正畸牙,对其一侧选用常规正畸加力,力值约每牙 20~25 g,另一侧健康同名牙不施加任何正畸力,作为同源对照,加力 1 d 后至 7 d 内拔除该正畸牙,各 20 颗,共 40 颗,分为加力组和对照组。选取临床诊断有牙髓炎症且无保留价值的第 3 磨牙 20 颗,分为炎症组。所有研究对象为 12 ~ 37 岁,无全身系统性疾病及关节炎病史。

1.2 主要试剂

兔抗人基质金属蛋白酶 2 多克隆抗体,兔抗人基质金属蛋白酶 9 多克隆抗体,兔 SP 检测试剂盒,DAB 显色试剂盒,以上试剂均为北京中杉金桥生物技术有限公司提供。

1.3 实验方法

牙齿拔除后立即穿通髓角,在 40 g/L 中性缓冲甲醛液、4℃下先固定 24 h,均匀磨除牙釉质及牙骨质以缩短脱钙时间,4℃下再固定 24 h 后,以 100 g/L EDTA 溶液 4℃下脱钙 4 周,常规脱水,石蜡包埋,制成 5 μm 切片。

采用链霉素抗生素蛋白—过氧化酶免疫组化法(SP 法)。多聚赖氨酸防脱片,60℃烤片 2 h,二甲苯脱蜡,梯度乙醇至水,30 ml/L 过氧化氢溶液室温下孵育 10min 以阻断过氧化物酶,微波抗原修复 20 min,PBS 洗 5 min × 3 次,100 ml/L 正常羊血清 37℃孵育 20 min, 滴加一抗,PBS 代替第一抗体作为阴性对照,4 ℃过夜。生物素标记二抗 37℃孵育 30 min,滴加辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素,每步骤间均用 PBS 洗 5 min × 3 次。DAB 显色,苏木精复染,分色,脱水,透明,中性树胶封片。

1.4 结果判定标准

采用半定量积分法[4],MMPs 染色阳性为细胞浆淡黄至棕黄色。每张切片随机选取 5 个不同的视野(× 400),分别计数阳性细胞数并计算其算术平均值。分级标准如下:

阳性细胞数评分:阳性细胞数 <5%,0 分;6% ~ 25%,1分;26% ~ 50%,2 分;>50%,3 分。

着色程度评分:无,0 分;淡黄,1 分;棕黄,2 分;棕褐,3 分。

将每张切片阳性细胞数与着色程度的得分相乘为最后得分,即以下公式:

阳性细胞数评分 × 着色程度评分 = 半定量最后得分

半定量最后得分 0 ~ 1 分为阴性 (-),2 ~ 3 分为弱阳性 (+),4 ~ 5 分为中度阳性(++),6 分以上为强阳性(+++)。由高年资免疫组化实验员在多头显微镜下阅片并打分。

1.5 统计学方法

采用 SPSS13.0 统计软件对数据进行统计分析,对各表达情况的例数进行 Wilcoxon 秩和检验,检验水准 α =0.05。

2 结 果

2.1 图像分析

通过 PBS 阴性对照(图 1),可发现对照组、加力组和炎症组牙髓均可见 MMP-9 的表达。对照组牙髓组织内 MMP-9 阳性细胞数较加力组的牙髓组织少。染色阳性部位定位于胞质,呈棕黄色颗粒;从阳性染色强度来看,在牙髓中央区域表达弱于外周(图 2)。在接受正畸力的牙髓组织,成牙本质细胞和牙髓成纤维细胞可见 MMP-9 表达,从阳性染色强度来看,在牙髓中央区域表达弱于外周;其表达明显强于作为同源对照的正常牙髓组织中的表达,却弱于炎症牙髓中的表达(图 3)。在炎症牙髓组织,成牙本质细胞、牙髓成纤维细胞和血管内皮细胞可见 MMP-9 表达,炎细胞浸润区表达呈阳性 (图 4)。

3 组中炎症牙髓中 MMP-9 的表达最强,接受正畸力的牙髓组织次之,同源对照的正常牙髓组织中最弱。

2.2 半定量积分分析

3 组 MMP-9 的半定量积分分析见表 1。

由表 1 可见,MMP-9 在 3 组中均为阳性表达;加力组牙髓中 MMP-9 的表达明显强于对照组牙髓,但其表达又弱于炎症组,经 Wilcoxon 秩和检验,其差异具有统计学意义(P<0.05)。

3 讨 论

3.1 正畸力对牙髓的影响

正畸力对牙髓的影响是复杂的生物学反应,正畸力适宜时牙根尖部血管受轻压,牙髓组织可发生



图 1 对照组牙髓中 MMP-9 的表达(PBS 阴性对照, SP,×400)



图 2 对照组牙髓中 MMP-9 的表达 (SP,×400)



图 3 接受正畸力后牙髓中 MMP-9 的表达 (SP,×400)



图 4 炎症牙髓中 MMP-9 的表达 (SP,×400)

表 1 三组 MMP-9 的半定量积分分析情况表(单位:颗)

	–	+	++	+++	合计
对照组	0	18	2	0	20
加力组	0	1	12	7	20
炎症组	0	0	4	16	20
合计	0	19	18	23	60

轻度充血、对温度的变化敏感,有时可出现牙髓活力下降,但并不出现显著的牙髓炎症改变,由于髓腔的特殊解剖生理结构,可因髓腔内压力增大而造成牙髓疼痛,一般可在矫治完成后恢复[5]。在牙髓组织的防御性炎症反应中,包括局部组织的非特异性炎症反应和特异性免疫反应,不可避免地会造成组织的损伤和破坏[6],这对正畸力致牙髓炎性反应的发生、发展具有重要的作用。口腔正畸的过程是牙齿颌骨接受各种矫治力的过程,正畸治疗的基础在于临床上熟知正畸力对患者机体的影响和正确运用生物力学原理。牙髓组织内血运丰富,但血循环和淋巴循环都只能通过狭小的根尖孔,为终支循环,因此牙髓对外界刺激而产生的病理变化往往发展为难以恢复的情况[7]。持续的正畸力可引起牙髓血流量的显著减少。若进一步发展,则可引起牙髓组织不可逆的损伤,甚至使牙髓组织陷于坏死[8]。

3.2 MMPs 与牙髓病

MMPs 是一种依赖二价金属阳离子的内肽酶家族,因含有 Zn^{2+}、Ca^{2+}金属离子而得名,通过降解 ECM 参与多种生理病理过程[9]。它们在一系列生理过程如胚胎发育、组织重塑、牙齿萌出、伤口愈合等生理现象中发挥关键作用[1]。同时也在一系列由 ECM 分解而导致的疾病如牙周病、关节病、肿瘤转移扩散以及某些炎症性自身免疫病的发生发展中起重要作用[10]。在牙髓组织中,牙髓细胞、成牙本质细胞是 MMPs 的主要合成细胞,其中牙髓细胞可产生大部分 MMPs, 到目前为止所发现的成牙本质细胞合成的 MMPs 有:MMP-2、MMP-3、MMP-8、MMP-9、MT1-MMP 和 MMP-20[11]。MMPs 在牙髓组织 ECM 代谢过程中发挥着关键性作用,是牙髓病过程中组织损伤机制中的重要因子,其基因表达、蛋白质合成以及活性的表达受到多种因素的调节[12],生理条件下,MMPs 的水平较低,其与基质金属蛋白酶特异性组织抑制剂(Tissue inhibitors of metalloproteinase, TIMPs)的平衡维持着牙髓组织的健康[2]。MMPs 在牙髓炎症中作用的探索近年来受到普遍关注,已经

证实 MMPs 的激活和表达参与牙髓炎症过程，同时，炎症牙髓中 MMP-9 增高，而且在某种程度上与牙髓炎患者的疼痛等主观症状相关[13]。

本实验中，MMP-9 在正常和炎症牙髓中表达均为阳性，且炎症牙髓中表达明显强于正常牙髓，该结果与冯谨等[14]的研究结果一致，表明 MMP-9 参与了牙髓炎症的病理过程，且可以反应出炎症的水平；接受正畸力的牙髓组织中，MMP-9 表达明显强于正常牙髓组织，表明两者在牙髓出现应激状态时即有表达增强，但表达水平弱于炎症牙髓，说明接受正畸力的牙髓还未发展至牙髓炎状态。而 MMP-9 在不同状态、不同部位表达不同，表明其表达水平可以反映出炎症的水平和进程。

3.3 实验设计分析

免疫组化是利用抗原与抗体特异性结合的原理，通过化学反应使标记抗体的显色剂显色来确定组织细胞内抗原，对其进行定位、定性及定量的研究。本实验除了对免疫组化染色切片进行图像分析，还应用了目前较常用的对 MMP-9 免疫组化研究的半定量积分分析[4]，将宏观染色情况判定与显微阳性细胞计数联系起来，可以较好的减少偏倚。

大多数学者认为，最适的矫治力以不引起牙周膜血运障碍的力值为度[15]。不同牙齿都存在一定承载的阈值，当力量大于矫治牙的阈值而小于支抗牙的阈值时，可以使牙齿产生差动效应。当压力增加时，牙齿移动加大，但当压力达到一定力值后，增加压力，牙移动的速度和距离并不加大。这一压力范围称为正畸有效压力的平衡区。当矫治力大于最适力时，被矫治牙虽然产生同样的移动效果，但也会出现不必要的损害。因此本研究采用的正畸力大小为 20~25 g，在最适矫治力范围内。而正畸患者一般在加力 1 d 后出现牙周和牙髓疼痛，7 d 左右后逐步缓解[5]。因此，本研究选取加力后拔牙时间为 1~7 d。

MMPs 作为 ECM 主要降解酶之一，是一把双刃剑，对牙髓既有保护性作用，又有引起损伤性作用。这种差异可能是由于牙髓病发病机制及不同的发病阶段所引起。所以如何确切判断 MMPs 对牙髓的影响，以及如何依此采取相应的促 MMPs 表达或抑制 MMPs 的过表达的措施，从而使 MMPs/ TIMPs 比例协调发挥正常的生理作用有可能成为牙髓病治疗的重要手段之一。正畸治疗的时间大约 2 年左右，疗程延长的原因很多，但其中部分原因是矫正治疗过程中产生的副作用[3]。如果在治疗中了解正畸力对牙髓中 MMPs 的影响，并正确运用生物力学原理，适当辅以 MMPs 的调节，不但可以缩短治疗时间，而且可以为不同个体设计出最佳治疗方案，提高治疗效率，并为患者提供更好的医疗服务。

参 考 文 献

[1] 裴端卿. The matrix metalloproteinase family: An introduction[J]. 中国生物化学与分子生物学报，2001，17(1)：1-6.

[2] 王凤明，陈新梅. 基质金属蛋白酶在牙髓病中作用的研究进展[J].牙体牙髓牙周病学杂志，2003，13(6)：348-351.

[3] 刘 鑫.正畸力对牙髓的影响[J].国际口腔医学杂志，2008，35(2)：141-143.

[4] 王利娟，杨筱凤，宗 璐，等. 滋养细胞肿瘤中 MMP-2、MMP-9 的表达与预后相关分析[J]. 第四军医大学学报，2006，27(17)：1588-1590.

[5] Subay R K，Kaya H，Tarim B，et al. Response of human pulpal tissue to orthodontic extrusive applications[J]. J Endod，2001，27(8)：508-511.

[6] 于世凤.口腔组织病理学[M]. 第 5 版.北京：人民卫生出版社，2003，154-155.

[7] 史俊南. 牙髓生物学[M].西安：世界图书出版西安公司，2005.28.

[8] Sano Y，Ikawa M，Sugawara J，et al. The effect of continuous intrusive force on human pulpal blood flow[J].Eur J Orthod，2002，24(2)：159-166.

[9] Freije J M，Balbín M，Pendás A M，et al. Matrix metalloproteinases and tumor progression[J]. Adv Exp Med Biol，2003，532：91-107.

[10] Hannas A R，Pereira J C，Granjeiro J M，et al. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment[J]. Acta Odontol Scand，2007，65(1)：1-13.

[11] Sulkala M，Larmas M，Sorsa T，et al. The localization of matrix metalloproteinase-20(MMP-20，enamelysin) in mature human teeth[J]. J Dent Res，2002，81(9)：603-607.

[12] 刘 鑫.牙髓中基质金属蛋白酶的生物调节[J]. 重庆医学，2007，36(23)：2448-2450.

[13] Gusman H，Santana R B，Zehnder M. Matrix metalloproteinase levels and gelatinolytic activity in clinically healthy and inflamed human dental plups[J]. Eur J Oral Sci，2003，111(3)：353.

[14] 冯 谨，陈新梅.基质金属蛋白酶在牙髓炎症中的活性及表达[J].实用口腔医学杂志，2005，21(5)：610-613.

[15] Ioi H，Morishita T，Nakata S，et al. Evaluation of physiological tooth movements within clinically normal periodontal tissues by means of periodontal pulsation measurements [J]. J Periodontal Res，2002，37(2)：110-117.

（责任编辑：冉明会）