

[文章编号] 1000-1182(2007)02-0118-04

糖尿病大鼠牙齿移动后牙周组织 基质金属蛋白酶-2表达的变化

冯智敏¹, 吴永生², 闫桂艳³

(1.河北大学附属医院 口腔科, 河北 保定 071000; 2.河北省人民医院 口腔正畸科, 河北 石家庄 050051;
3.河北省廊坊市卫生学校 口腔教研室, 河北 廊坊 065000)

[摘要] 目的 探讨糖尿病大鼠正畸牙齿移动过程中基质金属蛋白酶-2(MMP-2)的分布和表达变化, 研究糖尿病对牙周组织胶原代谢的影响。方法 选用80只雄性SD大鼠, 牵引左侧上颌第一磨牙近中移动。实验组以链脲佐菌素腹腔注射制备1型糖尿病模型, 3周后开始实验, 分别于加力后0、3、7、14、21 d处死大鼠, 应用两步免疫组化法检测大鼠牙周组织MMP-2的表达。结果 MMP-2免疫组化结果显示牙齿移动后, 牙周膜两侧MMP-2表达增加, 破骨细胞、骨细胞、成纤维细胞和部分成骨细胞MMP-2染色阳性。图像分析结果显示实验组变化较对照组小。平均光密度表现动态变化, 7 d最低, 而后缓慢升高。加力后积分光密度逐渐升高, 7 d达到顶峰, 而后缓慢下降, 21 d时仍维持在较高水平。结论 未加力时, 糖尿病大鼠颌骨胶原代谢增强。在正畸牙齿移动过程中, 糖尿病大鼠骨质反应能力降低, 胶原代谢较弱, 牙齿移动时MMP-2呈规律性变化, 与牙齿正畸骨改建关系密切, 在牙齿移动中起着重要的作用。

[关键词] 糖尿病; 正畸; 牙齿移动; 基质金属蛋白酶-2

[中图分类号] R780.2 **[文献标识码]** A

Change of Expression of Matrix Metalloproteinase-2 in the Periodontal Tissues of Diabetes Mellitus Rats during Orthodontic Tooth Movement FENG Zhi-min¹, WU Yong-sheng², YAN Gui-yan³. (1. Dept. of Stomatology, Hebei University Affiliated Hospital, Baoding 071000, China; 2. Dept. of Orthodontics, Hebei Provincial People's Hospital, Shijiazhuang 050051, China; 3. Dept. of Stomatology, Langfang Public Health School, Langfang 065000, China)

[Abstract] Objective To observe the expression and distribution of matrix metalloproteinase-2(MMP-2) in the periodontal tissues of diabetes mellitus(DM) rats during tooth movement, and to observe the affection of diabetes mellitus on the collagen metabolism. Methods Eighty male Sprague-Dawley rats were used. Mesial force was applied to pull the maxillary first molar. Forty rats were rendered diabetic by injection of streptozotocin. In 3 weeks after the injection, rats were subjected to lateral tooth movement. The animals were sacrificed after 0, 3, 7, 14 and 21 days respectively. Two-step immunohistochemical method was applied to localize and examine the expression of MMP-2 in periodontal tissue of rats. Results MMP-2 immunohistochemical results indicated that the MMP-2 expression increased and was observed on both sides periodontium of movement tooth, osteoclast, cementoblast, osteocyte, fibroblast and osteoblast appeared positive. According to the immunohistochemistry image analysis, experiment group changes was less obvious than control group. Dynamic changes of OD occurred, reaching the minimum on the 7th day and then increasing slowly. IOD increased steadily, up to the peak on the 7th day, and then decreased, which still remained a high level on the 21st day. Conclusion DM alveolar bone collagen metabolism increases. DM alveolar bone reactive potency decreases in orthodontic tooth movement, weak collagen metabolism. MMP-2 activity changes regularly, in close relation to bone remodeling, and plays an important role during the orthodontic tooth movement.

[Key words] diabetes mellitus; orthodontic; tooth movement; matrix metalloproteinase-2

[收稿日期] 2006-12-03; [修回日期] 2007-02-27

[基金项目] 河北省科技厅重点资助项目(01276199D)

[作者简介] 冯智敏(1974-), 女, 河北人, 主治医师, 硕士

[通讯作者] 吴永生, Tel: 0311-85988037

糖尿病是常见的代谢内分泌病, 近年来糖尿病的发生呈迅速上升趋势, 且发病年龄趋于年轻化^[1]。糖尿病可影响胶原的合成、成熟和降解, 甚至影响胶原分子本身的结构, 降低胶原的力度, 增加骨髓

性,还可使胶原溶解性增加,使明胶酶和胶原酶活性增强^[2]。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)在正畸骨改建过程中发挥着不可替代的作用,不仅直接参与骨基质降解,而且破骨细胞的迁移和贴附也依赖于部分MMPs的活动^[3-4]。本研究旨在通过建立糖尿病大鼠牙移动模型,观察糖尿病大鼠正畸牙移动对牙周组织胶原代谢的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

链脲佐菌素(Sigma公司,美国), MMP-2 Ab-7 抗体(NuoMarkers公司,美国), PV-6001羊抗兔 IgG-HRP、DAB 5028BB DAB kit(北京中杉公司), 血糖仪(雅培公司,美国), 显微镜(Olympus公司,日本)。

1.2 实验动物和分组

选取由河北医科大学动物实验中心提供的健康雄性SD大鼠80只,体重为200~220 g,6~8周龄。普通块料分笼饲养,自由摄食饮水,12 h昼夜循环。将SD大鼠随机分为对照组和实验组,每组40只;对照组和实验组又随机分为0、3、7、14、21 d 5小组,每小组8只。

1.3 方法

1.3.1 糖尿病模型的建立 实验组按照每公斤体重50 mg剂量腹腔注射链脲佐菌素(溶于0.1 mol/L柠檬酸缓冲液,pH为4.4),72 h后血糖大于13.8 mmol/L,尿糖+++为成模;对照组注射等量柠檬酸缓冲液。3周后进行牙移动实验。

1.3.2 牙移动模型的建立 3%戊巴比妥钠(每公斤体重40 mg)和3%水合氯醛复合麻醉对照组和实验组SD大鼠,使用牙科钻的细金刚砂车针在大鼠的左侧上颌第一磨牙和左侧上颌切牙颈部磨沟,深约0.5 mm,然后在两牙之间拴两端打结的弹力线,长约0.5 cm,拉伸后产生0.294 N的力,0.2 mm不锈钢钢丝结扎固定左侧上颌切牙,使左侧上颌第一磨牙向近中移动。

1.3.3 免疫组化染色 取左侧上颌第一磨牙区牙及牙周组织块,4%多聚甲醛固定48~72 h,7%EDTA 4 脱钙2个月,将标本按磨牙近远中方向切片,片厚约4 μm,使用MMP-2 Ab-7抗体,采用两步法进行免疫组化染色。37 烤片1周,脱蜡至水。3% H₂O₂封闭内源性过氧化物酶10 min, PBS冲洗3次,每次5 min,滴加一抗(MMP-2)1:50,37 孵育2 h, PBS冲洗3次,每次5 min,滴加PV-6001羊抗兔IgG-HRP,37 孵育30 min, PBS冲洗3次,每次5 min, DAB显色。蒸馏水充分冲洗,苏木素复染、脱水、

透明、封片。阴性对照以PBS代替一抗,阳性对照为感染性结肠组织。MMP-2阳性表达为棕黄色,定位于细胞质,强阳性表达时也可见胞核着色。

1.3.4 图像分析 对免疫组化染色结果进行图像分析,测量左侧上颌第一磨牙牙周组织压力侧和张力侧各5个高倍视野的平均灰度和阳性面积值,计算并比较平均光密度(OD)和积分光密度(IOD)。计算方法为:T=投射光(物体平均灰度)/入射光(标定最亮处平均灰度),物体平均光密度=lg(1/T),积分光密度=物体平均光密度×阳性面积。

1.4 统计学处理

采用SPSS 13.0统计软件对所获取的数据进行统计学处理,对各组数据进行正态性检验,对积分光密度进行对数转换,采用两样本均数比较t检验,结果用 $\bar{X} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 免疫组化染色结果

0 d时,实验组和对照组移动牙齿牙周组织中可见少量破骨细胞、骨细胞细胞质中MMP-2呈阳性着色,牙周膜染色浅。随着牙齿受力移动时间增长,实验组中阳性细胞数量增多,两侧牙周膜成纤维细胞染色比0 d时染色加深。3 d时,实验组移动牙牙根压力侧牙槽骨边缘有大量破骨细胞骨吸收陷窝,破骨细胞细胞质中MMP-2呈强阳性着色(图1),牙槽骨中也可见大量MMP-2染色阳性的破骨细胞;张力侧也可见阳性破骨细胞。7 d时压力侧MMP-2阳性破骨细胞达到高峰,而后缓慢减少;张力侧也可见阳性破骨细胞。14 d时压力侧牙本质吸收处破牙本质细胞MMP-2染色强阳性(图2);张力侧MMP-2阳性破骨细胞减少。21 d时压力侧MMP-2阳性破骨细胞继续减少,张力侧牙槽骨边缘偶见呈MMP-2阳性着色的成骨细胞(图3)。

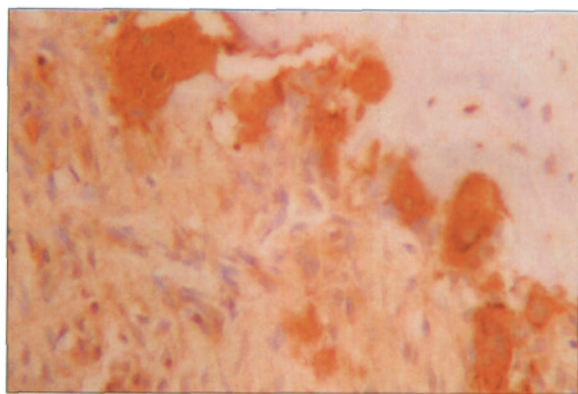


图1 3 d时,移动牙齿牙周组织大量破骨细胞MMP-2染色阳性 PV ×200

Fig 1 More osteoclasts appear MMP-2 positive in the periodontal tissue of the moved tooth after 3 days PV ×200

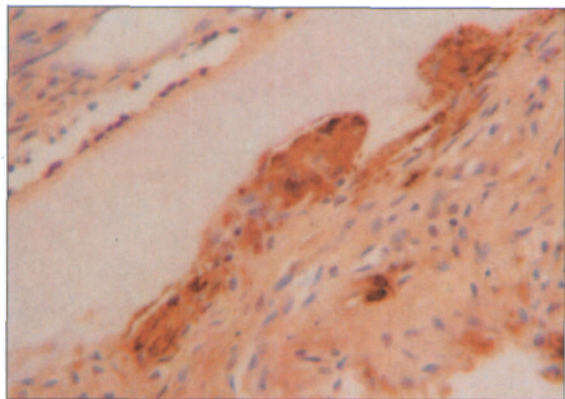


图2 14 d时, 移动牙齿牙周组织压力侧破牙本质细胞MMP-2染色阳性 PV ×200

Fig 2 Cementoblasts appear MMP-2 positive on the pressure side of the moved tooth s periodontal tissue after 14 days PV ×200

2.2 图像分析结果

实验组和对照组中张力侧和压力侧的OD值见表1。由表1可见, OD值表现为动态变化, 先下降, 至7 d时达到最低, 然后缓慢升高。0 d时, 实验组两侧OD值均小于对照组。3 d时, 实验组压力侧和张力侧OD值均小于对照组。7 d时, 实验组压力侧和张力侧OD值均大于对照组 ($P<0.05$)。14 d时, 实验组压力侧OD值小于对照组 ($P<0.01$); 实验组张力侧OD值小于对照组。21 d时, 实验组压力侧OD值大于对照组 ($P<0.05$), 实验组张力侧OD值大于对照组。

表1 实验组和对照组压力侧和张力侧的平均光密度 $n=8, \bar{x} \pm s$

Tab 1 OD of the experiment group and control group in the pressure side and the tension side $n=8, \bar{x} \pm s$

分组	压力侧OD值					张力侧OD值				
	0d	3d	7d	14d	21d	0d	3d	7d	14d	21d
实验组	0.51 ±0.05	0.40 ±0.07	0.36 ±0.07	0.42 ±0.02	0.51 ±0.02	0.51 ±0.05	0.41 ±0.08	0.35 ±0.05	0.41 ±0.02	0.47 ±0.06
对照组	0.56 ±0.02	0.43 ±0.06	0.28 ±0.02	0.47 ±0.02	0.49 ±0.01	0.56 ±0.02	0.43 ±0.07	0.28 ±0.02	0.44 ±0.04	0.44 ±0.05

表2 实验组和对照组压力侧和张力侧的积分光密度 $n=8, \bar{x} \pm s$

Tab 2 IOD of the experiment group and control group in the pressure side and the tension side $n=8, \bar{x} \pm s$

分组	压力侧IOD值					张力侧IOD值				
	0d	3d	7d	14d	21d	0d	3d	7d	14d	21d
实验组	1.97 ±0.31	2.79 ±0.32	2.96 ±0.26	2.59 ±0.38	2.50 ±0.27	1.97 ±0.31	2.56 ±0.54	2.84 ±0.45	2.79 ±0.39	2.38 ±0.36
对照组	1.22 ±0.64	2.61 ±0.46	3.29 ±0.26	3.05 ±0.42	2.35 ±0.24	1.22 ±0.64	2.59 ±0.37	3.27 ±0.20	3.00 ±0.53	2.16 ±0.15

3 讨论

MMPs是一组结构上有 Zn^{2+} 的内源性肽酶, 主要参与细胞外基质的降解。除在组织的生理性重建过程中发挥重要作用外, MMPs在结缔组织的病理性降解过程中也具有重要作用。明胶酶具有降解变性的、型胶原的特异能力, 也可切割天然、型胶原。对纤维粘蛋白、骨粘蛋白、巨球蛋白、腱糖蛋白、肌原纤维蛋白也有一定作用^[5]。Creemers等^[6]研究发现明胶酶的活性和体内的结缔组织(牙髓、牙周膜、磨牙牙龈和皮肤)胶原降解转换率之间有显著的关联。在组织中给予足量的明胶酶特别是明胶酶A(MMP-2), 使用选择性的明胶酶抑制剂CT1166, 发现由于明胶酶的抑制导致48 h内胶原降解减少90%, 并与剂量相关。明胶酶A降解胶原的能力表现为通过添加有活性的明胶

实验组和对照组中张力侧和压力侧的IOD值见表2。由表2可见, IOD逐渐升高, 7 d达到顶峰, 而后缓慢下降, 21 d时仍维持在较高水平。0 d时, 实验组两侧IOD值均大于对照组 ($P<0.05$)。3 d时, 实验组压力侧IOD值大于对照组; 实验组张力侧IOD值小于对照组。7 d时, 实验组压力侧和张力侧IOD值均小于对照组 ($P<0.05$)。14 d时, 实验组压力侧IOD值小于对照组 ($P<0.05$); 实验组张力侧IOD值小于对照组。21 d时, 实验组压力侧和张力侧IOD值均大于对照组。

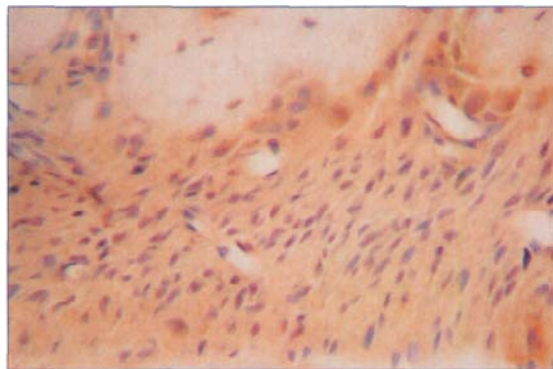


图3 21 d时, 移动牙齿牙周组织张力侧成骨细胞MMP-2染色阳性 PV ×200

Fig 3 Osteoblasts appear MMP-2 positive on the tension side of the moved tooth s periodontal tissue after 21 days PV ×200

蛋白、巨球蛋白、腱糖蛋白、肌原纤维蛋白也有一定作用^[5]。Creemers等^[6]研究发现明胶酶的活性和体内的结缔组织(牙髓、牙周膜、磨牙牙龈和皮肤)胶原降解转换率之间有显著的关联。在组织中给予足量的明胶酶特别是明胶酶A(MMP-2), 使用选择性的明胶酶抑制剂CT1166, 发现由于明胶酶的抑制导致48 h内胶原降解减少90%, 并与剂量相关。明胶酶A降解胶原的能力表现为通过添加有活性的明胶

酶诱导失去生机的分离块降解。因此由MMPs介导结缔组织胶原降解过程中,明胶酶起着重要作用。

MMP-2表达于破骨细胞、破牙骨质细胞、骨细胞、成纤维细胞、成骨细胞。加力后阳性细胞增多,压力侧破骨细胞、破牙骨质细胞MMP-2呈强阳性,即MMP-2与骨吸收关系密切。结果还显示3 d和7 d在张力侧牙周膜和牙槽骨中存在大量阳性的破骨细胞,表明此时张力侧骨吸收和胶原代谢活跃。Rice等^[7]通过原位杂交观测到胚胎发育16 d的小鼠颅骨中破骨细胞分泌大量MMP-9,而且集中于骨形成活跃的区域,MMP-2与MMP-9同为明胶酶,其作用机制可能一致。

0 d时,MMP-2的表达实验组较对照组强,表明在未加力情况下实验组胶原代谢增强。MMP-2的表达增强可能与糖尿病骨吸收因子表达增多有关^[9]。Kusano等^[9]研究发现,用白细胞介素-1、白细胞介素-6刺激培养的鼠头颅骨组织时可促进骨组织分泌MMP-2、MMP-9,说明依赖MMP-2、MMP-9的骨基质降解在白细胞介素-1、白细胞介素-6诱导的骨吸收过程中起到重要的作用,白细胞介素-1还可明显提高培养的成骨细胞表达MMP-2 mRNA的水平。MMP-2的表达增强可能与糖尿病骨质疏松有关^[10]。在对骨质疏松的研究中发现在骨质疏松大鼠骨组织中MMP-9 mRNA较正常小鼠高^[11]。糖尿病甲状旁腺素(parathyroid hormone, PTH)水平增强^[12],PTH在诱导MMP-2中起了重要的作用。Kawashima-Ohya等^[13]培养生长板软骨细胞,发现PTH/PTH-rp增加MMP-2的表达。这也可能是实验组MMP-2表达增强的原因之一。

加力后MMP-2表达增强,呈规律性变化。表达强度(OD)先下降后升高,7 d达到最低点,OD下降可能与表达面积增加有关。平均光密度对照组变化幅度较大,3、7、14、21 d与0 d比较均有统计学意义,而实验组3、7、14 d与0 d比较有统计学意义,21 d与0 d比较无统计学意义,表明实验组组织反应较弱,变化减少。牙齿移动后各个时段MMP-2表达数量(IOD)均较0 d高,在7 d达到顶峰,而后缓慢下降,21 d时仍维持在较高水平,表明牙齿移动过程中胶原代谢活跃。本实验结果与Redlich等^[14]研究基本一致。本实验结果显示,积分光密度在7 d和14 d压力侧、7 d张力侧实验组明显小于对照组,表明糖尿病在机械外力刺激下于骨吸收期胶原代谢较弱,应激能力下降。

(致谢:感谢第四军医大学卫生统计学教研室徐勇教授的指导和帮助!)

[参考文献]

- [1] 王克安,李天麟,向红丁,等.中国糖尿病流行特点研究:糖尿病和糖耐量低减患病率调查[J].中华流行病学杂志,1998,19(5):282-285.
(WANG Ke-an, LI Tian-lin, XIANG Hong-ding, et al. Study on the epidemiological characteristics of diabetes mellitus and IGT in China[J]. Chin J Epidemiol, 1998, 19(5): 282-285.)
- [2] Ryan ME, Usman A, Ramamurthy NS, et al. Excessive matrix metalloproteinase activity in diabetes: Inhibition by tetracycline analogues with zinc reactivity[J]. Curr Med Chem, 2001, 8(3): 305-316.
- [3] Holliday LS, Vakani A, Archer L, et al. Effects of matrix metalloproteinase inhibitors on bone resorption and orthodontic tooth movement[J]. J Dent Res, 2003, 82(9): 687-691.
- [4] Sato T, Foged NT, Delaisse JM. The migration of purified osteoclasts through collagen is inhibited by matrix metalloproteinase inhibitors[J]. J Bone Miner Res, 1998, 13(1): 59-66.
- [5] 樊明文.口腔生物学[M].北京:人民卫生出版社,2001:320-325.
(FAN Ming-wen. Oral biology[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2001: 320-325.)
- [6] Creemers LB, Jansen ID, Docherty AJ, et al. Gelatinase A(MMP-2) and cysteine proteinases are essential for the degradation of collagen in soft connective tissue[J]. Matrix Biol, 1998, 17(1): 35-46.
- [7] Rice DP, Kim HJ, Thesleff I. Detection of gelatinase B expression reveals osteoclastic bone resorption as a feature of early calvarial bone development[J]. Bone, 1997, 21(6): 479-486.
- [8] Salvi GE, Beck JD, Offenbacher S. PGE₂, IL-1 beta, and TNF-alpha responses in diabetics as modifiers of periodontal disease expression[J]. Ann Periodontol, 1998, 3(1): 40-50.
- [9] Kusano K, Miyaura C, Inada M, et al. Regulation of matrix metalloproteinases(MMP-2, -3, -9, and -13) by interleukin-1 and interleukin-6 in mouse calvaria: Association of MMP induction with bone resorption[J]. Endocrinology, 1998, 139(3): 1338-1345.
- [10] Bain S, Ramamurthy NS, Impeduglia T, et al. Tetracycline prevents cancellous bone loss and maintains near-normal rates of bone formation in streptozotocin diabetic rats[J]. Bone, 1997, 21(2): 147-153.
- [11] Zhao H, Cai G, Du J, et al. Expression of matrix metalloproteinase-9 mRNA in osteoporotic bone tissues[J]. J Tongji Med Univ, 1997, 17(1): 28-31.
- [12] 许曼音.糖尿病性骨病[M].上海:上海科学技术出版社,2003:600-602.
(XU Man-yin. Diabetic osteopathy[M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2003: 600-602.)
- [13] Kawashima-Ohya Y, Satakeda H, Kuruta Y, et al. Effects of parathyroid hormone(PTH) and PTH-related peptide on expressions of matrix metalloproteinase-2, -3, and -9 in growth plate chondrocyte cultures[J]. Endocrinology, 1998, 139(4): 2120-2127.
- [14] Redlich M, Reichenberg E, Harari D, et al. The effect of mechanical force on mRNA levels of collagenase, collagen type , and tissue inhibitors of metalloproteinases in gingivae of dogs[J]. J Dent Res, 2001, 80(12): 2080-2084.