

[文章编号 1000-1182(2004)04-0325-03

基质金属蛋白酶-9、基质金属蛋白酶-2在非负荷期 种植体周围骨组织改建过程中的表达

刘 丽¹,何福明¹,李乐乐¹,胡济安²

(1. 浙江大学医学院附属口腔医院 修复科; 2. 浙江大学医学院附属口腔医院 病理科, 浙江 杭州 310006)

[摘要] 目的 探讨基质金属蛋白酶-9、2(MMP-9, MMP-2)在种植体与骨组织界面愈合过程中的作用。方法 在不同时间将种植体植入英国小猎兔犬的前牙及前磨牙区,取得种植不同时间段的标本,用免疫组织化学染色法观察不同时间段种植体周围骨组织中MMP-9、2表达的变化。结果 MMP-9主要表达在破骨细胞、巨噬细胞、衬细胞及成纤维细胞的细胞质中;MMP-2主要表达在成骨细胞、成纤维细胞的细胞质及部分破骨细胞中。结论 MMP-9、2在种植体植入后周围损伤骨组织的吸收、愈合和骨重建中起重要作用。

[关键词] 种植体; 骨整合; 基质金属蛋白酶

[中图分类号] R 783 [文献标识码] A

The Expression of MMP-9, MMP-2 in the Remodeling Bone Tissue around Implant during Unloaded Period LIU Li¹, HE Fu-ming¹, LI Le-le¹, HU Ji-an². (1. Dept. of Prosthodontics, the Affiliated Stomatologic Hospital, College of Medical Sciences, Zhejiang University; 2. Dept. of Pathology, the Affiliated Stomatological Hospital, College of Medical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310006, China)

[Abstract] **Objective** To discuss the function of MMP-9, MMP-2 in the remodeling bone tissue around implant during unloaded period. **Methods** At the anterior of the maxilla and mandibular of the Beagle dog, implants were placed at different periods, so the implant specimens of different periods were obtained after dogs were killed. The implant specimens were removed, fixed in 4% paraformaldehyde for 24 hours at 4℃, decalcified with 10% EDTA at pH7.2, embedded in paraffin wax and sectioned. The observation of the expression changes of the MMP-2, MMP-9 in the milieu bone tissue of the implant at different periods were taken by immunohistochemical staining. **Results** Matrix metalloproteinase (MMP-9) was mostly expressed at the peripheral cytoplasmic of osteoclast, macrophage, lining cell and fibroblast. MMP-2 was mostly expressed at the peripheral cytoplasmic of osteoblast, fibroblast, some osteoclast also expressed this enzyme. **Conclusion** MMP-2 and MMP-9 have an important function at the injured bone absorption, healing and bone remodeling after dental implant placement.

[Key words] implants; osseointegration; matrix metalloproteinase

基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)是骨吸收和骨改建的关键酶,是一组具有很多共同生化性质的,参与降解包括骨在内的全身各种组织细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的蛋白酶家族¹。明胶酶(gelatinases)是基质金属蛋白酶类家族中的一个亚家族,包括明胶酶A(MMP-2)和明胶酶B(MMP-9)。MMP-2、MMP-9是机体参与细胞外基质降解的重要蛋白酶,在正常性和病理性(破骨细胞性)骨吸收中发挥重要作用。本研究运用免疫组化方法观察种植体植入到形成骨整合这一过程中MMP-2、MMP-9表达情况,探讨其在种植体周围骨吸收和骨改建过程中的作用。

1 材料和方法

1.1 种植体制备

直径3.0 mm,长9 mm的圆柱型螺纹状的二段式非埋植型种植体(由杭州西湖生物材料研究所提供)。种植体经400℃热氧化45 min,使表面形成一层致密的金红石型的二氧化钛膜,厚约13 nm。用无水乙醇超声清洗5 min,经20 min高温高压灭菌后备用。

1.2 实验动物

选用健康成年英国小猎兔犬(由浙江大学医学院实验动物中心提供)2条,体重分别为9、11 kg。

1.3 种植时间和部位

分不同时间段植入,同一时间段取种植标本,在植入后3、6、9、12、15、20、30 d(上颌前牙区和前磨牙区);60、90、120 d(下颌前牙区)和150 d(下颌前磨牙区)等时间段都各有2个标本。

[收稿日期 2004-01-02; 修回日期 2004-06-27

[基金项目]浙江省自然科学基金资助项目(397497)

[作者简介]刘 丽(1955-),女,河北人,教授,硕士

[通讯作者]何福明, Tel: 0571-87217431

1.4 种植方法

常规手术拔除上、下颌的前牙、前磨牙,术后给予常规颗粒饲料。术后给予肌注林可霉素 0.3 ml/d,共 3 d。3 个月后行延期种植。采用粘骨膜开窗加非埋植型种植术方式,在充分水冷却条件下用相应直径的环行刀在牙槽嵴顶环行切粘骨膜达骨面,去除剥离的粘骨膜后暴露钻孔骨面,用组合钻钻至所需的深度和直径,再用专用器械将种植体旋转到底,顶端与黏膜平齐,达到初期稳固性,然后旋上愈合螺帽。这样上、下颌种植体无咬合接触。

1.5 标本制备

标本用 4%多聚甲醛磷酸缓冲液 4 固定 24 h, 10%EDTA 4 脱钙约 2 个月²,常规石蜡包埋切片。

1.6 免疫组织化学染色检测

1.6.1 所需试剂 MMP-2 鼠单克隆抗体、MMP-9 鼠单克隆抗体和链霉素抗生素蛋白-过氧化酶免疫组化染色超敏试剂盒均购自迈新公司。

1.6.2 染色过程 石蜡切片脱蜡、水化后按照试剂盒说明操作,其中滴加 MMP-2 或 MMP-9 抗体后室温下孵育 90 min,滴加新鲜配制的 DAB 溶液 3~5 min,自来水冲洗,苏木精复染 15 s,温水返蓝。最后脱水、中性树胶封片。阴性对照组以 PBS 代替 抗。

2 结果

2.1 MMP-2 免疫组化观察

种植体植入后 3 d,种植体与骨组织之间的炎症细胞、成纤维细胞出现 MMP-2 表达阳性;种植体植入后 6、9 d 达到高峰(图 1)。纤维结缔组织中的单核巨细胞、间质细胞、成骨细胞均呈强阳性染色;部分破骨细胞出现阳性染色,其位置主要在骨吸收陷窝内。种植体植入 12~30 d 时,纤维结缔组织中的阳性细胞开始逐渐减少,新骨表面的成骨细胞、种植体与骨组织之间的致密的成纤维细胞层大部分细胞仍呈 MMP-2 染色阳性。种植体植入 2~5 个月时,染色阳性部位集中在种植体与骨组织界面之间的小骨髓间隙内(图 2),周围骨髓腔中偶见阳性表达的成骨细胞。

2.2 MMP-9 免疫组化观察

种植体植入后 3 d,破骨细胞出现 MMP-9 表达阳性;种植体植入后 6、9 d,MMP-9 阳性细胞数达到高峰。在种植体与骨组织之间,结缔组织细胞(主要是成纤维细胞)和分散在其中的破骨细胞、单核巨细胞大部分呈强阳性染色,个别破骨细胞呈阴性(图 3)。种植体植入 12~30 d,结缔组织中的阳性细胞明显减少,骨吸收陷窝表面的破骨细胞、种植体与骨组织之间的巨噬细胞、单核巨细胞仍呈 MMP-9 染色阳性。

种植体植入 2~5 个月时,阳性部位集中在种植体与骨组织界面之间小的骨髓间隙内的细胞质和基质(图 4),周围的骨髓腔中也有偶见阳性表达的破骨细胞。



图 1 种植体植入 6 d,MMP-2 在成纤维细胞和骨表面的成骨细胞中呈棕黄色阳性表达 SP ×400

Fig 1 Six days after implants placement the fibroblasts and the osteoblasts located bone surface expressed MMP-2 positively SP × 400



图 2 种植体植入 4 个月,种植体周围的骨髓腔内可见 MMP-2 阳性表达的细胞和基质 SP ×400

Fig 2 Four months after implants placement the cells and matrix located the bone marrow space about implants expressed MMP-2 positively SP ×400

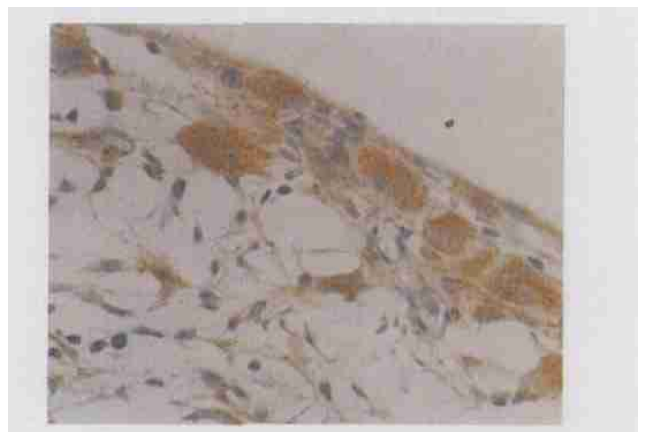


图 3 种植体植入 6 d,种植体周围可见大量破骨细胞为 MMP-9 染色阳性,细胞质呈棕黄色,多核 SP ×400

Fig 3 Six days after implants placement a great deal of osteoclasts had multinucleus between implant and bone tissue, which MMP-9 stained positively and cytoplasm was light brown SP ×400

3 讨论

MMPs是一组含 Zn^{2+} 的能够降解细胞外基质的蛋白酶,通常在中性条件下发挥活性,有 Ca^{2+} 参与时活性最大。近年来有关 MMPs 在骨吸收机制中的研究已取得重大突破。Hill 等³ 研究显示,破骨细胞可表达多种 MMPs,人工合成的胶原酶抑制剂以及特异性抑制因子-1 (tissue inhibitors of metalloproteinase, TIMP-1) 和 TIMP-2 均能显著抑制骨吸收,提示 MMPs 在骨吸收中发挥重要作用。现已证明有多种 MMPs 参与了骨基质的吸收过程,包括 MMP-1、2、3、9、10、13⁴ 以及 MT1-MMP 和 MT2-MMP 等。



图4 种植体植入4个月,在个别区域种植体与骨组织之间存在少量的纤维结缔组织为MMP-9染色强阳性 SP $\times 400$

Fig 4 Four months after implants placement there were little connective tissue at very few space between implant and bone tissue, which MMP-9 stained was strong positively SP $\times 400$

Einhorn 等⁵ 认为骨折早期(3 d 时)的炎症反应阶段 IL-1 可以呈高表达高活性。Kusano 等⁴ 研究发现 IL-1 可明显提高培养的成骨细胞表达 MMP-2 mRNA 的水平,用 IL-1 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 MMPs 的骨基质降解在 IL-1 诱导的骨吸收过程中起到重要的作用。近来研究发现 MMP-2 不仅可降解变性的 I 型胶原,还可以降解天然的 I 型胶原。种植体植入术后早期在种植体周围的软硬组织中可出现明显的急性炎症反应,因此推测炎症反应区的 IL-1 呈高活性。本实验中 MMP-2 主要表达在成纤维细胞、成骨细胞、血管内皮细胞及部分破骨细胞的细胞质。MMP-2 在种植体周围骨组织中的表达具有时间变化特性。

Tezuka 等⁶ 研究发现 MMP-9 在破骨细胞中特异性高表达。Engsig 等⁷ 发现 MMP-9 可特异性降解非矿化的软骨和释放细胞外基质结合的血管内皮生长因子,发挥其直接趋化、活化破骨细胞的作用。本实验中 MMP-9 主要表达在结缔组织细胞、破骨细胞、单核巨细胞(破骨细胞前体)、巨噬细胞的胞浆。种植体

植入后 3 d 种植体与骨组织之间的炎性细胞、骨髓间质细胞(成纤维细胞)、破骨细胞和巨噬细胞均呈 MMP-9 阳性染色,到 6~9 d 时达到高峰,以后逐渐下降。MMP-9 阳性强度具有时间变化特点。因此, MMP-9 在一些衬细胞中的表达,可能与去除骨表面类骨质层,便于破骨细胞与矿化基质粘附有关;而骨髓单核细胞(包括单核破骨前体细胞)中 MMP-9 的表达,可能反映该酶参与破骨细胞的发育和募集过程。

从 MMP-2、MMP-9 在种植体周围骨组织中的表达时间和分布形式来看, MMP-2、MMP-9 的作用是降解种植体植入时损伤的骨基质、协调破骨细胞的募集和促进损伤骨组织的破骨细胞性骨吸收的进行。

Rice 等⁸ 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,因此推测 MMP-9 在骨的早期发育中占有重要作用。Dew 等⁹ 研究发现 MMP-9 和 TIMP-2 常常表达在相同区域,他们认为 MMP-9 可能在骨组织矿化过程中起重要作用。本实验发现在种植体植入后 2~5 个月时 MMP-2、MMP-9 主要表达在骨吸收陷窝表面的骨基质和破骨细胞以及种植体与骨组织之间的部分结缔组织细胞和基质中,提示明胶酶在维持种植体与骨界面之间的骨性结合形成中起重要作用。

[参考文献]

- 1] 解 熹,祝 威. 基质金属蛋白酶及其在耳胆脂瘤骨吸收发病机理的研究J. 国外医学耳鼻喉科分册, 2000, 24(3): 147-150.
- 2] 李琼英,全 毅,肖邦良. EDTA 脱钙法在硬组织酶组织化学中的应用J. 华西口腔医学杂志, 1988, 6(1): 68-69.
- 3] Hill PA, Murphy G, Docherty AJ, et al. The effects of selective inhibitors of matrix metalloproteinases (MMPs) on bone resorption and the identification of MMPs and TIMP-1 in isolated osteoclasts J. J Cell Sci, 1994, 107(pt11): 3055-3064.
- 4] 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.
- 5] Einhorn TA, Majeska RJ, Rush EB, et al. The expression of cytokine activity by fracture callus J. J Bone Miner Res, 1995, 10(8): 1272-1281.
- 6] Tezuka K, Nemoto K, Tezuka Y, et al. Identification of matrix metalloproteinase 9 in rabbit osteoclasts J. J Biol Chem, 1994, 269 (21): 15006-15009.
- 7] Engsig MT, Chen QJ, Vu TH, et al. Matrix metalloproteinase 9 and vascular endothelial growth factor are essential for osteoclast recruitment into developing long bones J. J Cell Biol, 2000, 151 (4): 879-889.
- 8] 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.
- 9] Dew G, Murphy G, Stanton H, et al. Localisation of matrix metalloproteinases and TIMP-2 in resorbing mouse bone J. Cell Tissue Res, 2000, 299(3): 385-394.

(本文编辑 汤亚玲)