

[文章编号 1000-1182(2005)02-0113-03

基质金属蛋白酶-1对根面牙本质有机质降解作用的超微结构观察

贺长历¹,王 铎¹,刘振华¹,金 洁²,宫艳红³

- (1. 山东大学口腔医院 牙体牙髓病科,山东 济南 250012;
2. 武汉大学口腔医院 牙体牙髓病科,湖北 武汉 430079;
3. 山东省千佛山医院 口腔科,山东 济南 250014)

[摘要] 目的 观察基质金属蛋白酶-1(MMP-1)对根面牙本质有机质的降解作用。方法 收集临床拔除的健康无龋阻生牙,切取根颈1/3处约5 mm厚的牙体,制成牙本质组织块,随机分为4组。第1组用酸溶液脱矿处理21 d后,放入MMP-1溶液中孵育7 d;第2组仅用酸溶液脱矿处理21 d;第3组仅用MMP-1溶液酶解7 d;第4组为正常牙本质标本对照组,不作任何处理。将各标本切割制作样本,脱水干燥,喷金,扫描电镜观察。结果 酸和酶溶液共同处理的标本牙本质硬组织脱矿明显,牙本质小管管腔失去原有形态,边界不清,周围暴露的胶原纤维断裂不连续,排列杂乱不规则。酸或酶溶液单独处理组未发生明显的基质纤维降解现象。结论 内源性蛋白酶参与了根面龋的发生发展过程,MMP-1能够明显降解脱矿后的牙本质有机质。

[关键词] 基质金属蛋白酶-1; 牙本质; 根面龋; 扫描电镜

[中图分类号] R 780.2 **[文献标识码]** A

The Effect of Matrix Metalloproteinase-1 on Root Surface Dentin Matrix: a Scanning Electron Microscope Observation

HE Chang-li¹, WANG Duo¹, LIU Zhen-hua¹, JIN Jie², Gong Yan-hong³. (1. Dept. of Endodontics, College of Stomatology, Shandong University, Jinan 250012, China; 2. Dept. of Endodontics, College of Stomatology, Wuhan University, Wuhan 430079, China; 3. Dept. of Stomatology, Qianfoshan Hospital of Shandong Province, Jinan 250014, China)

Abstract Objective To observe the effect of matrix metalloproteinase-1(MMP-1) from human host on degradation of dentin organic matrix of root dentin. **Methods** The freshly extracted caries-free impacted teeth were selected. Teeth were cut transverse ly under the enamel-cementum junction into dentin sections with a thickness of about 5 mm. Then all sections with removal of cementum, pulp and predentin were randomly divided into four groups. In the first group, dentin sections were demineralized with acid solution for 21 days, and then incubated with MMP-1 solution for 7 days; the second group were only treated with acid solution for 21 days; the third group were only attacked by MMP-1 solution for 7 days; and the fourth group were untreated as a control. Then all sections were dehydrated in ascending strength of alcohol, critically dried, coated with platinum, and then observed under scanning electron microscope(SEM). **Results** The dentin sections of root surface attacked by acid and MMP-1 showed that demineralization of dentin mineral and degradation of dentin matrix fibrae synchronously happened. The dentin matrix fibrae wasn't degraded in the groups treated with acid or MMP-1. **Conclusion** The proteinases from human host may play an important role in the development of root surface caries. MMP-1 may distinctly degradate the organic matrix of demineralized dentin.

Key words matrix metalloproteinase-1; dentin; root surface caries; scanning electron microscope

龋病的发生和发展所包括的无机质脱矿主要由口腔内致龋菌产酸造成,有机质降解是由不同种类蛋白酶溶解所引起。降解牙本质基质的酶类有外源性(细菌源性)和内源性(宿主源性)两种。龋损区细菌来源的蛋白酶的作用国内外学者已有大量的研究报道,而对宿主源性蛋白酶的研究却较少。基质金属蛋

白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)是宿主来源的蛋白水解酶家族成员之一,近来有学者^{1,2}在人牙本质龋中发现了它的存在,并分离出若干种MMPs。本文采用扫描电镜观察MMP-1降解根面牙本质有机质后牙本质形态,以期探讨MMP-1对根面牙本质有机质的降解作用机制。

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器

pH 4.5的0.1 mol/L 醋酸溶液(含1%的麝香草

[收稿日期 2003-12-08; 修回日期 2004-09-01

[基金项目]山东省自然科学基金资助项目(L2000CO2)

[作者简介]贺长历(1976-),女,山东人,住院医师,硕士

[通讯作者]王 铎, Tel: 0531-8382623

酚);高度纯化的 MMP-1 (Sigma 公司,美国),使用时配制成 pH 为 7.4 的 500 mg/L 的 MMP-1 酶溶液(含有 50 mmol/L 的 4-羟乙基哌嗪乙磺酸, 10 mmol/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.2 mol/L NaCl 和 1% 的麝香草酚);761 型电热恒温培养箱(南宁医疗器械修配厂);S-570 型扫描电镜(日立公司,日本)。

1.2 方法

1.2.1 标本制备 收集 5 颗新鲜拔除的健康无龋阻生恒磨牙(根尖均已发育完成)。刮除根面附着的软组织,在 5.25% 次氯酸钠溶液中剧烈振荡 5 min,冷水冲洗。水冷却下沿牙冠颊舌向纵劈开牙体,然后平齐釉牙骨质界分离冠根,切下根颈 1/3 处约 5 mm 厚的牙体,去净根面牙骨质、前期牙本质和牙髓组织。制取 10 个牙本质组织块。随机取 2 个标本脱矿后常规切片,苏木精-伊红染色,光学显微镜下检查牙骨质、前期牙本质及牙髓组织已去除干净。

1.2.2 标本处理 将其余 8 个标本紫外光消毒 2 h,随机分成 4 组,每组 2 个标本。第 1 组和第 2 组分别加入 10 ml 醋酸溶液,置恒温箱 37℃ 孵育 21 d,取出标本,蒸馏水冲洗干燥。将其中一组标本立即加入 2 ml MMP-1 酶溶液,同样条件下孵育 7 d,取出标本,蒸馏水冲洗干燥。第 3 组加入 2 ml MMP-1 酶溶液,相同条件孵育 7 d,取出标本,蒸馏水冲洗干燥。第 4 组为正常标本对照组,蒸馏水冲洗干燥待测。

1.2.3 扫描电镜观察 将各标本均制成表面积为 1.0 cm × 0.5 cm 的牙本质块,用超声波去除表面的玷污层,经 1.5% 的戊二醛溶液固定,乙醇脱水干燥,喷金,以去除牙骨质后的牙本质表面作为观察面,扫描电镜下观察牙本质超微结构的变化。

2 结果

酸和 MMP-1 酶溶液共同处理标本的扫描电镜观察结果见图 1。从图 1 可见,牙本质硬组织脱矿明显,牙本质小管管腔失去原有形态,边界不清,周围暴露的胶原纤维断裂不连续,排列杂乱不规则。仅经酸溶液处理标本的扫描电镜观察结果见图 2。从图 2 可见,牙本质硬组织脱矿明显,牙本质小管管腔粗大不规则,周围暴露的胶原纤维连续,未见胶原断裂降解破坏现象。仅经 MMP-1 酶溶液处理标本的扫描电镜观察结果见图 3。从图 3 可见,牙本质小管管腔周围硬组织矿化沉积明显,未发现暴露的胶原纤维,与正常标本相比未发现异常改变。未经酸或酶溶液处理正常标本的扫描电镜观察结果见图 4。从图 4 可见,牙本质小管管腔周围硬组织矿化沉积明显,无脱矿和胶原纤维暴露。

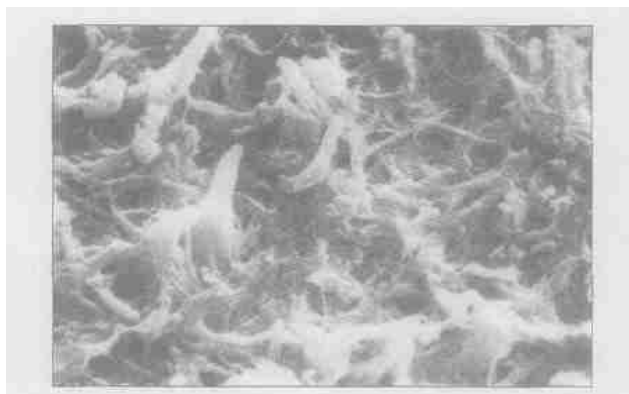


图 1 经酸和 MMP-1 酶处理的牙本质标本 SEM ×3 000

Fig 1 The dentin sample with acid and MMP-1 solution SEM ×3 000

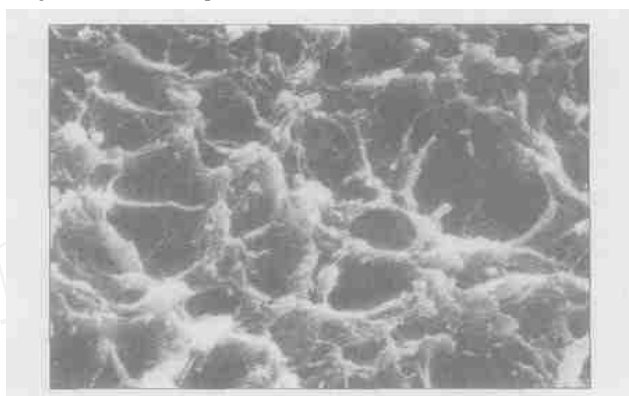


图 2 仅经酸处理的牙本质标本 SEM ×3 000

Fig 2 The dentin sample only with acid solution SEM ×3 000



图 3 仅经 MMP-1 酶处理的牙本质标本 SEM ×3 000

Fig 3 The dentin sample only with MMP-1 solution SEM ×3 000

3 讨论

龋损区宿主来源的内源性蛋白酶主要由白细胞、成纤维细胞、巨噬细胞、唾液腺、龈上皮细胞及血清产生, MMPs 就是其中的一种。已经证明在全唾液、龈沟液、牙菌斑中存在 MMPs, 类型包括 MMP-1、MMP-2、MMP-8 和 MMP-9³。目前在人类牙本质龋中已发现并分离出 MMP-1、MMP-2、MMP-8、MMP-9 和 MMP-20 共 5 种基质金属蛋白酶^{1,2}。Van Strijp 等⁴

发现 MMPs 能被细菌酶和宿主来源的蛋白酶(如组织蛋白酶)激活,唾液和牙本质胶原中存在 MMP-1、MMP-2、MMP-9 和组织蛋白酶,并且唾液 MMPs 的活性和组织蛋白酶的活性呈正相关。龋坏牙本质中的 MMPs 大部分来自唾液,而唾液中的大部分 MMPs 来自牙周围的龈沟液⁵。Sulkala 等² 发现成牙本质细胞可分泌 MMPs 到牙本质液中,在牙本质形成初期与牙本质同时产生,在龋坏进展中释放。这说明龋坏牙本质中的 MMPs 大部分来源于宿主。



图4 未经酸和 MMP-1 酶处理的牙本质标本 SEM ×3 000

Fig 4 The dentin sample without acid or MMP-1 solution SEM ×3 000

基质金属蛋白酶是由多种蛋白酶组成的多功能内肽酶,它能降解几乎所有的细胞外基质蛋白,包括天然的和变性的不同种类胶原^{6,7}。根据其作用底物不同分为 5 类,即间质胶原酶类(MMP-1 等)、明胶酶类(MMP-2 等)、基质分解素类(MMP-3、MMP-7 等)、膜性金属蛋白酶类(MMP-14 等)及其他(MMP-20 等)。其中间质胶原酶类主要降解 I、II、III 型胶原⁸。MMP-1 又称为 I 型胶原酶或胶原酶-1,主要由成纤维细胞表达,因此又称为成纤维型胶原酶,酶原相对分子质量为 52 kD、57 kD,是 MMPs 中的间质胶原酶的一种。MMP-1 降解 I 型胶原可能与本身结构有关。MMPs 的 C-末端具有一个椭圆形的盘状结构称为类血凝素酶域,由 4 个叶状的 α -螺旋结构组成,是 MMPs 裂解三螺旋的胶原纤维所必需的结构,它能作用于胶原的三螺旋结构 N 端的甘氨酸-亮氨酸或甘氨酸-亮氨酸肽键,将胶原切成 3/4、1/4 两个片段,从而造成胶原结构的降解破坏⁹。有学者^{10,11} 采用脱矿后的牙本质标本,经过不同处理后,观察 400 mg/L 胶原酶或 100 mg/L 胰蛋白酶对牙本质胶原的降解作用,实验结果表明 400 mg/L 胶原酶和 100 mg/L 胰蛋白酶对牙本质胶原有明显的分解作用。鉴于 MMP-1 与胶原酶的同源性及其来源途径较多¹²,本实验采用 500 mg/L 的 MMP-1 作用于脱矿后的牙本质标本。结果表明, MMP-1 对人根面牙本质有机质有明显的降解作用,但这种作用必须在酸预处理的情况下才能发

生。酸和 MMP-1 酶溶液共同处理标本的表面胶原纤维束失去其束状排列,暴露的胶原纤维呈断裂状,而单独酶溶液处理的标本却未发生明显的胶原降解。有实验表明,只有用酸对牙根进行脱矿处理后,根部有机质才能被非特异性蛋白水解酶如胶原酶等所降解¹³。酸还可以使根面大部分的非胶原蛋白释出,而非胶原蛋白的降解可改变牙体组织内胶原的结构,增加其对非特异性蛋白水解酶的敏感性,进而促进胶原蛋白的水解。如果牙体硬组织未发生脱矿,则矿化的基质对蛋白水解酶不敏感¹⁴。本实验结果与上述结论一致,皆说明作为内源性的基质金属蛋白酶在牙本质龋的发病过程中起重要作用。

[参考文献]

- 1] Tjaderhane L, Larjava H, Sorsa T, et al. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions J. J Dent Res, 1998, 77(8): 1622-1629.
- 2] 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): 603-620.
- 3] Ingman T, Tervahartiala T, Ding Y, et al. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gingival crevicular fluid and saliva of periodontitis patients J. J Clin Periodontol, 1996, 23(12): 1127-1132.
- 4] Van Strijp AJP, Jansen DC, De Groot J, et al. Host-derived proteinases and degradation of dentin collagen in situ J. Caries Res, 2003, 37(1): 58-65.
- 5] Kennedy S, Davis C, Abrams WR, et al. Submandibular salivary proteases: lack of a role in anti-HIV activity J. J Dent Res, 1998, 77(7): 1515-1519.
- 6] Birkedal-Hansen H. Proteolytic remodeling of extracellular matrix J. Curr Opin Cell Biol, 1995, 7(5): 728-735.
- 7] 刘来奎,李怡宁,江宏兵,等. 口腔癌前沿细胞基质金属蛋白酶-2 表达与颈淋巴结转移的关系 J. 华西口腔医学杂志, 2004, 22(2): 106-108.
- 8] Borkakoti N. Matrix metalloproteases: variations on a theme J. Prog Biophys Mol Biol, 1998, 70(1): 73-94.
- 9] Nagase H, Woessner JF. Matrix metalloproteinases J. J Biol Chem, 1999, 274(31): 21491-21494.
- 10] 李玉晶,杨玉琴. 氟铂酸铵对牙本质胶原分解的抑制作用 J. 牙体牙髓牙周病学杂志, 1997, 7(1): 1-3.
- 11] 李艳君,唐荣银,吕昕,等. 五倍子提取液对牙本质龋蚀时胶原蛋白分解的影响 J. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2002, 12(5): 252-254.
- 12] Wilhelm SM, Javed T, Miller RL. Human gingival fibroblast collagenase: purification and properties of precursor and active forms J. Coll Relat Res, 1984, 4(2): 129-152.
- 13] Dung SZ, Gregory RL, Li Y. Effect of lactic acid and proteolytic enzymes on the release of organic matrix components from human root dentin J. Caries Res, 1995, 29(6): 483-489.
- 14] Goldberg M, Keil B. Action of a bacterial Achromobacter collagenase on the soft carious dentine J. J Biol Buccale, 1989, 17(4): 269-274.

(本文编辑 王 晴)