

基质金属蛋白酶-3 和金属蛋白酶组织抑制因子-1 在兔下颌牵张成骨改建期的表达及意义

邹淑娟 王志国 胡 静 李继华

【摘要】 目的 研究基质金属蛋白酶-3(MMP-3)和金属蛋白酶组织抑制因子-1(TIMP-1)在下颌骨牵张后形成的新骨组织中的定位表达。方法 对 8 只成熟大耳白兔按每天 1 mm 的牵张速率延长双侧下颌骨 6 mm,在牵张结束后第 4 周处死动物,取牵张区新骨标本作组织学和免疫组化检测。结果 MMP-3 与 TIMP-1 在牵张骨痂中均呈高水平表达,MMP-3 阳性信号主要定位于新生骨小梁边缘的成骨细胞和埋入新骨基质中的骨细胞,TIMP-1 则定位于成骨细胞。结论 MMP-3 及 TIMP-1 可协同调节胞外基质的降解来影响牵张成骨的改建过程。

【关键词】 下颌骨牵张; 基质金属蛋白酶-3; 金属蛋白酶组织抑制因子-1; 骨改建

Expression of Matrix Metalloproteinase-3 and Tissue Inhibitor Metalloproteinases-1 in Regenerated Rabbit Bone after Mandibular Osteodistraction

ZOU Shujuan*, WANG Zhiguo, HU Jing, et al. (* Department of Orthodontics, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

【Abstract】 Objective To observe the expression patterns of matrix metalloproteinase-3 and its inhibitor, tissue inhibitor metalloproteinases (TIMP)-1, in remodeling phase of mandibular distraction osteogenesis. **Methods** Bilateral mandibular osteotomies were performed in 8 mature rabbits. The mandibles were lengthened 6 mm using a custom-made distractor with a rate of 1 mm/d. All animals were killed in 4 weeks after completion of distraction. The distracted calluses were harvested and processed for histology and immunohistochemistry of MMP-3 and TIMP-1. **Results** Elevated expression of both MMP-3 and TIMP-1 was found in the distracted calluses resulting from mandibular lengthening. Positive staining for MMP-3 was seen in the osteoblasts and osteocytes, and TIMP-1 was mainly localized in osteoblasts. **Conclusion** MMP-3 and TIMP-1 appear to play important roles in the remodeling of new bone created by mandibular distraction osteogenesis.

【Key words】 mandibular osteodistraction; matrix metalloproteinase-3; tissue inhibitor metalloproteinases-1; bone remodeling

牵张成骨 (distraction osteogenesis, DO) 最早由矫形外科用于延长四肢长骨,近年来该技术在颅面骨发育不足和缺损畸形的整复中显示出独特的优势。由于牵张力的刺激,牵张成骨的新骨成积速率是正常儿童快速骨生长率的 4~6 倍^[1]。DO 是通过一系列复杂细胞和分子生物学行为完成的,其中细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的降解和合成是调控新骨组织改建过程的关键环节。过去的研究发现,基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 和金属蛋白酶组织抑制因子 (tissue inhibitor metalloproteinases,

TIMPs) 系统在骨生长过程的胞外基质的更新重建中起着至关重要的作用^[2,3]。本研究通过兔下颌牵张成骨动物模型,观察 MMP-3 与 TIMP-1 在其新骨改建时期的表达模式并探讨其生物学意义。

1 材料和方法

1.1 材料

健康成熟大耳白兔 (四川大学华西动物实验中心提供) 10 只,雌雄各半,体重 3.0~3.2 kg。兔下颌牵张器由设在四川大学华西口腔医学院的教育部口腔生物医学工程重点实验室研制。SP 免疫组化试剂盒、MMP-3 及 TIMP-1 多克隆抗体 (Santa Cruz 公司,美国),生物素化羊抗 IgG (抗) (Sigma 公司,美国)。

1.2 方法

全麻下经颌下切口对其中 8 只动物行下颌骨切开术,并安置下颌牵张器。经 7 d 间歇期后,按每天 1 mm (2 次/d, 0.5 mm/次) 的牵张速率向前逐渐延长双侧下颌骨 6 mm。在牵

本课题为高等学校博士点专项科研基金 (编号 20020610062) 及四川大学校基金 (2002 年) 资助项目

作者单位:610041 四川大学华西口腔医院口腔正畸科 (邹淑娟), 四川大学华西口腔医院口腔颌面外科 (王志国,胡 静,李继华)

张结束后第 4 周处死动物,取牵张区骨痂用 10 % 中性福尔马林液固定 7 d。EDTA 脱钙,乙醇逐渐脱水,石蜡包埋后作 4 μm 连续切片。随机抽取 5 张切片作苏木精—伊红染色,10 张切片按说明书要求和步骤采用 SP 免疫组化法检测 MMP-3 及 TIMP-1 表达情况。MMP-1 和 TIMP-1 抗体工作浓度分别为 1:100 和 1:80,以棕色颗粒代表这两种因子的阳性信号。以未进行下颌骨切开术和下颌骨牵张术的 2 只动物为对照组,按上面相同的方法获取正常下颌骨组织切片。

2 结 果

所有手术组动物的下颌骨均被成功延长。X 线检查显示牵张区有新骨生成和钙化(图 1)。苏木精—伊红染色显示牵张间隙内有大量沿牵张力方向排列的新生骨小梁生成,骨改建活动明显(图 2)。

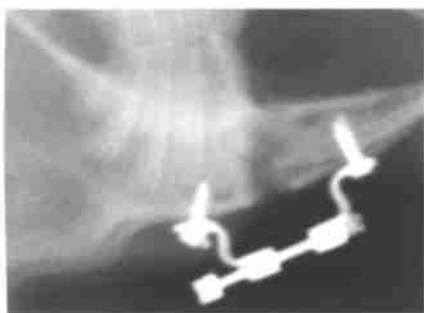


图 1 X 线检查显示下颌牵张后有新骨形成

Fig 1 Mandibular radiography showed bone formation in the distracted area

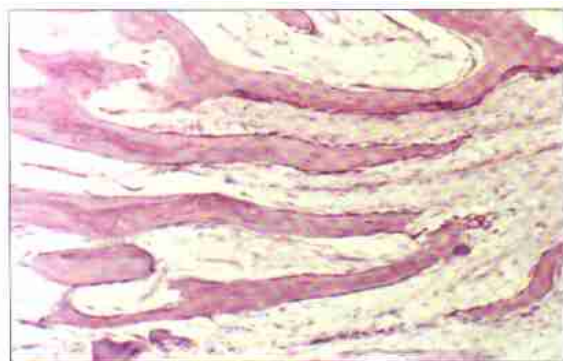


图 2 组织学观察见许多沿牵张力方向排列的新生骨小梁形成
HE $\times 100$

Fig 2 Histological examination showed the newly formed trabecular bone parallel to the distraction forces HE $\times 100$

在下颌骨牵张后形成的新骨组织中均可检测到 MMP-3 和 TIMP-1 的高水平表达。MMP-3 强阳性表达主要定位于新生骨小梁边缘的成骨细胞和埋入新骨基质中的骨细胞(图 3)。TIMP-1 强阳性表达主要定位于成骨细胞(图 4)。对照组正常骨组织中,这两种因子几乎没有或仅有微弱表达。

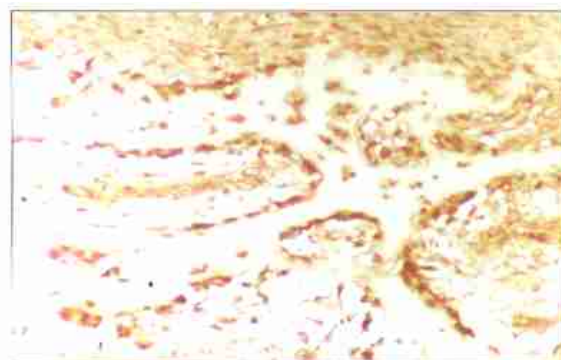


图 3 MMP-3 阳性染色定位于围绕新生骨小梁的成骨细胞和埋入骨基质的骨细胞 SP $\times 200$

Fig 3 Strong staining for MMP-3 was seen in the osteoblasts around the newly formed trabecular bone and the osteocytes entombed in the bone matrix SP $\times 200$

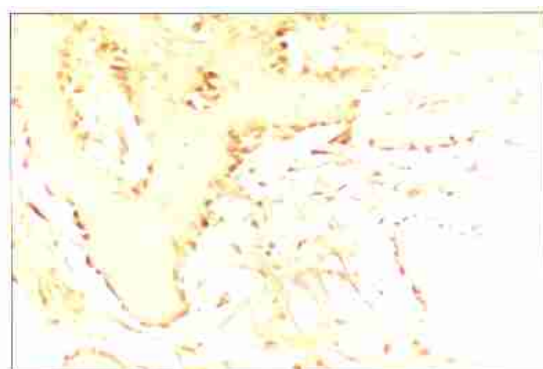


图 4 TIMP-1 阳性信号主要定位于新生骨小梁边缘的成骨细胞
SP $\times 200$

Fig 4 Positive expression of TIMP-1 was detected in the osteoblasts at the edge of the newly formed trabecular bone SP $\times 200$

3 讨 论

用牵张成骨矫治各种颌骨发育不足畸形是 20 世纪 90 年代发展起来的一种新的外科—正畸联合治疗技术,全过程包括间歇期、牵张期和固定期,固定期一般为 6~8 周。本实验设计是为了观察 MMPs 和 TIMPs 系统在 DO 后新骨改建时期的表达模式,选择牵张结束后第 4 周作为观察点,是因为这个时间正处于牵张力刺激形成的新生骨组织改建的活跃期。

MMPs 是一族锌离子依赖性蛋白酶,在正常的 pH 环境中几乎参与所有 ECM 的降解过程;MMP-3 属于 MMPs 家族中基质溶解素(stromelysins)类的一种,因此又称为基质溶解素-1。MMP-3 的作用底物广泛,可以单独降解构成胞外基质的主要成分,同时还可以激活其他种类的 MMPs 共同参与 ECM 的降解⁴。MMPs 降解基质的活性要受一组特殊的称为 TIMPs 的因子调节,TIMP-1 是其中一种重要因子,可以抑制

(下转第 363 页)

甲硝唑根管消毒控释系统。该制剂具有根管消毒和根管充填双重作用。为弥补药物本身渗透压的不足,在制备药物贮库时加入渗透活性物质葡萄糖等,外包控释膜由 PEG 1500 与醋酸纤维素等组成,PEG 1500 遇到水分子溶解,在控释膜上致孔,水分子通过控释膜进入药物贮库内,使药物与葡萄糖溶解成饱和溶液,形成高渗透压,因贮库内外存在渗透压梯度,故有渗透泵样作用。通过调节控释膜中 PEG 1500 含量,可以调节持续释药的时间。

离体牙根周释药的实验表明,CDGMC 在离体牙中 1~8 d 释药量基本稳定,以后虽然释药量减少,但到第 10 天根周环境的甲硝唑和环丙沙星的释药量仍远远大于两者的最低抑菌浓度(MIC)^{3,4},这有利于保持根管内的药物浓度,对根管内牙本质小管、侧枝根管的细菌产生持续性抑菌作用,防止根管再感染。文献报道⁵,口服 200 mg 甲硝唑 1 h 后平均血清浓度为 4.9 mg/L,而 CDGMC 的用药量可大大减少,因此,具有安全可靠的优点,可减少全身毒副作用的发生,

(上接第 343 页)

MMP-3 的活性,从而影响整个 MMPs 和 TIMPs 系统。在机体生理状态下,组织的正常更新和改建有赖于 MMPs 与 TIMPs 之间的动态平衡,否则可能导致病理状态的产生。过去的研究显示 MMPs 能介导软骨成骨(endochondral ossification)的基质降解过程^{3,5},但近年有文献²报道 MMPs 和 TIMPs 也参与了膜内成骨(intramembranous ossification)过程。牵张成骨是以膜内成骨为主,其新骨的改建和塑形是通过细胞—基质交互作用和胞外基质的降解和合成交替进行而完成的。本研究发现 MMP-3 在牵张间隙内新生骨小梁周围的成骨细胞和埋入骨基质内的骨细胞中有强烈表达,表明由成骨细胞分泌的 MMP-3 积极参与了新骨改建过程,高水平表达的 MMP-3 介导胞外基质的局部降解以提供生存空间给不断增殖的各种活性细胞。有研究⁶认为基质主要成分之一的蛋白多糖(proteoglycan)能够阻止钙化进程,MMP-3 可以促进蛋白多糖的降解使得牵张后形成的新骨组织的钙化得以顺利进行。但过多的 MMP-3 有可能激活潜在的 TIMP-1 基因,引起 TIMP-1 在成骨细胞中的高水平表达,从而达到 MMP-3 与 TIMP-1 之间的动态平衡,防止新骨基质的过度降解和病理状态的发生。

笔者通过兔下颌牵张成骨动物模型,用免疫组化技术观察了 MMP-3 与 TIMP-1 在牵张成骨固定期表达模式,结果显示这两种因子在新生骨组织改建

并可延长复诊时间,减少复诊次数。可见,CDGMC 作为一种新型的根管消毒材料,在牙髓病和根尖周病的治疗方面具有良好的应用前景。

参考文献

- 1 Hoshino E, Kurihar N, Sato I, et al. *In vitro* antibacterial susceptibility of bacteria taken from infected root dentin to a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline. *J Int Endod*, 1996, 29 (2): 125-130
- 2 汪天平,王 铎,高 静,等. 甲硝唑根管消毒控释系统的临床应用研究. *实用口腔医学杂志*, 1999, 15(3): 213-215
- 3 Brogden RN, Heel RC, Speight TM, et al. Metronidazole in anaerobic infections: A review of its activity, pharmacokinetics and therapeutic use. *Drugs*, 1978, 16(4): 387
- 4 戴自英,刘裕昆,汪 复主编. *实用抗菌药理学*. 第 2 版. 上海:上海科学技术出版社, 1998: 76-83
- 5 Loeche E, Schmidit BA, Smith R, et al. Metronidazole therapy for periodontitis. *J Periodontal Res*, 1987, 22(3): 224

(2002-05-20 收稿, 2003-01-06 修回)

(本文编辑 邓本姿)

过程中均呈高水平表达,从而保证胞外基质的有序降解和新生骨段的改建塑形以适应要承受的力学负荷和功能环境。

参考文献

- 1 Aronson J, Harrison BH, Stewart CL. The histology of distraction osteogenesis using different external fixators. *Clin Orthop*, 1989, 241(2): 106-111
- 2 Bord S, Horner A, Hembry RM, et al. Distribution of matrix metalloproteinases and their inhibitor, TIMP-1, in developing human osteophytic bone. *J Anat*, 1997, 191(1): 39-48
- 3 Breckon JJW, Hembry RM, Reynolds JJ, et al. Matrix metalloproteinases and TIMP-1 localization at site of osteogenesis in the craniofacial region of the rabbit embryo. *Anat Rec*, 1995, 242 (2): 177-187
- 4 李永明,林 珠,冯 雪,等. MMP-3 及 TIMP-1 在正畸牙周组织改建过程中的表达. *实用口腔医学杂志*, 2000, 16(6): 417-419
- 5 Breckon JJW, Hembry RM, Reynolds JJ, et al. Regional and temporal changes in the synthesis of matrix metalloproteinases and TIMP-1 during development of the rabbit mandibular condyle. *J Anat*, 1994, 184(2): 99-110
- 6 Brown CC, Hembry RM, Reynolds LL. Immunolocalization of metalloproteinases and their inhibitor in the rabbit growth plate. *J Bone Joint Surg*, 1989, 71A: 580-593

(2002-06-18 收稿, 2003-06-01 修回)

(本文编辑 王 晴)