

[文章编号] 1000-1182(2010)06-0660-04

牙周炎症时基质金属蛋白酶-9的表达与胎膜早破的关系

杨丽丽¹ 程敏² 许为³ 程琳²

(1.吉林大学第一医院 妇产科; 2.吉林大学口腔医院 预防科;

3.吉林大学第二医院 妇产科, 吉林 长春 130041)

[摘要] 目的 分析牙周状况与胎膜早破的关系, 为孕前及孕期妇女口腔疾病防治提供依据。方法 选择18例早产胎膜早破孕妇设为PPROM组, 20例足月胎膜早破孕妇设为PROM组, 28例足月正常孕妇作为对照组, 检查并记录3组的菌斑指数(PLI)、探诊深度(PD)和龈沟出血指数(SBI), 并采用免疫组织化学法检测宫颈部胎膜基质金属蛋白酶-9(MMP-9)的分布与表达, 分析MMP-9与牙周状况的关系。结果 PPROM组和PROM组胎膜MMP-9的表达强度均高于对照组, 且差异有统计学意义。绒毛膜中MMP-9表达与PD没有相关性($r=0.053$, $P=0.075$), 与SBI呈正相关($r=0.433$, $P<0.05$), 与PLI呈正相关($r=0.310$, $P<0.05$)。羊膜中MMP-9表达与PD没有相关性($r=0.077$, $P=0.597$), 与SBI呈正相关($r=0.430$, $P<0.05$), 与PLI呈正相关($r=0.324$, $P<0.05$)。结论 MMP-9参与了胎膜早破及牙周炎症的病理过程。

[关键词] 胎膜早破; 牙周炎症; 基质金属蛋白酶-9

[中图分类号] R 781.4 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1000-1182.2010.06.023

Study on the relationship between the expression of matrix metalloproteinase-9 and premature rupture of membrane as pregnant women with periodontal inflammation YANG Li-li¹, CHENG Min², XU Wei³, CHENG Lin². (1. Dept. of Gynaecology and Obstetrics, The First Hospital of Jilin University, Changchun 130041, China; 2. Dept. of Preventive Dentistry, Stomatology Hospital of Jilin University, Changchun 130041, China; 3. Dept. of Gynaecology and Obstetrics, The Second Hospital of Jilin University, Changchun 130041, China)

[Abstract] **Objective** To analyze the relationship between periodontal condition and premature rupture of membrane(PROM) in order to provide basis to keep pregnant women from oral diseases. **Methods** 18 cases of preterm pregnant women with PROM(Group PPROM) and 20 cases of full term pregnant women with PROM(Group PROM) were selected as the study group, and 28 cases of full term normal pregnant women were selected as the control group. Everyone's plaque index(PLI), probing depth(PD) and sulcular bleeding index(SBI) were checked and recorded. Meanwhile, immunohistochemical method was used to detect the distribution and expression of matrix metalloproteinase-9(MMP-9) in fetal membrane of cervix. The relationship between the expression of MMP-9 and PROM was analyzed. **Results** The expression of MMP-9 in the pregnant women with PROM(Group PPROM and Group PROM) was higher than that in the control group. There was no relationship between the expression of MMP-9 in chorion and PD($r=0.053$, $P=0.075$). The expression of MMP-9 in chorion had direct correlation with SBI($r=0.433$, $P<0.05$) and PLI($r=0.310$, $P<0.05$). The expression of MMP-9 in amniotic membrane hadn't dependence with PD($r=0.077$, $P=0.597$), while had direct correlation with SBI($r=0.430$, $P<0.05$) and PLI($r=0.324$, $P<0.05$). **Conclusion** MMP-9 was involved in the pathological process of PROM and periodontal inflammation.

[Key words] premature rupture of membrane; periodontal inflammation; matrix metalloproteinase-9

胎膜早破(premature rupture of membrane, PROM)的原因是多方面的, 如双胎、胎位异常、头盆不称, 感染和机械性损伤等, 但其确切的发病机制尚

未完全清楚。越来越多的证据表明, 亚临床的生殖道或其他器官系统的感染对妊娠的结果有负面影响。妊娠期由于激素水平升高, 牙龈对局部的刺激反应增强, 从而加重了牙菌斑引起的炎症反应, 感染及其随后的宿主炎性反应可导致体内炎性介质增加, 所形成的免疫微环境在PROM中起到了非常重

[收稿日期] 2009-11-27; [修回日期] 2010-03-20;

[作者简介] 杨丽丽(1982—), 女, 吉林人, 硕士

[通讯作者] 程敏, Tel: 0431-85579578

要的作用。

本研究通过比较PROM孕妇与正常孕妇的牙周状况,并采用免疫组织化学法检测其宫颈部胎膜基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)-9的分布与表达,分析牙周状况与PROM的关系,为临床针对PROM的病因实施预防和治疗提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 研究对象

选择2008年4—9月在长春市妇产科医院诊断为早产PROM而住院治疗的孕妇18例设为PPROM组,孕妇年龄(27.4 ± 2.4)岁,孕龄(35.7 ± 0.8)周;同期选择足月PROM孕妇20例设为PROM组,孕妇年龄(27.2 ± 2.1)岁,孕龄(39.0 ± 1.0)周;另外同期选择择期剖宫产分娩的胎膜完整的孕妇28例设为对照组,孕妇年龄(27.4 ± 2.3)岁,孕龄(39.1 ± 1.0)周。

PROM的诊断及分类标准参照《妇产科学》第7版^[1]。所有入选者均无高血压、心脏病、糖尿病、肝炎、肾炎、肿瘤等疾病史,无妊娠并发症及内外科合并症,无临床发热体征。

1.2 资料收集

牙周检查:由经过培训的专业人员用CPI牙周探针检查牙齿,分别检查 $\frac{61}{6}|\frac{6}{16}$,每颗牙齿检查6个位点(近中颊、颊面中央、远中颊、近中舌、舌面中央及远中舌位点),记录菌斑指数(plaque index, PLI)^[2]、探诊深度(probing depth, PD)^[3]、龈沟出血指数(sulcus bleeding index, SBI)^[2]。以PD>3 mm为牙周炎症记分标准^[3],若PD>3 mm即说明牙龈有炎症,超出正常的龈沟深度。

胎膜采集:在剖宫产术中取子宫下段近宫口处胎膜1块,大小约1.0 cm×1.0 cm。选取标本后于30 min内用质量分数10%甲醛溶液固定,常规石蜡包埋。

1.3 试验方法

1.3.1 主要仪器 光学显微镜(Olympus公司,日本),微量移液器(Gilson公司,芬兰),石蜡切片机、组织烘片机、组织摊片机、组织包埋机(Leica公司,德国),电热股份干燥箱(上海实验仪器厂有限公司),电热恒温培养箱(上海一恒科学仪器有限公司)。

1.3.2 试验步骤 标本组织取得后浸泡于10%甲醛溶液中固定24 h,然后予以常规石蜡包埋、切片,制成4 μm厚切片。先行苏木精-伊红染色,再将切片贴附于涂有多聚赖氨酸的玻璃片上备用,待下一步的免疫组织化学染色。抗体检测采用免疫组织化学SP法,按试剂盒说明书进行。免疫组织化学SP法主要操作步骤:切片脱蜡至水,蒸馏水洗,滴加3%过氧

化氢溶液于切片,室温处理10 min以消除内源性过氧化物酶;PBS洗3次,每次5 min;山羊免疫血清封闭,室温孵育15 min,倾去血清,勿洗,滴加1:100稀释的MMP-9,置于4℃冰箱过夜;PBS洗3次,每次5 min,然后滴加生物素标记的二抗,37℃孵育10 min;PBS洗3次,每次5 min,滴加辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素工作液,37℃孵育10 min;PBS洗3次,每次5 min, DAB显色,作用1~2 min,显微镜下观测至显色满意,蒸馏水终止显色。苏木精复染,盐酸乙醇分化,流水冲洗1 min,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。

1.3.3 结果判定 细胞内有棕黄色或棕褐色颗粒沉着即为染色的MMP-9蛋白,为阳性表达,定位于细胞质。采用Motic Images Advanced 3.2图像分析系统,于每张切片放大400倍视野中随机选择4个视野,测定该视野显色区的综合光密度值,并求平均值;平均值越高, MMP-9表达量越多。

1.4 统计学处理

采用SPSS 11.5统计软件进行分析,统计方法采用Pearson相关分析和单因素方差分析,检验水准为双侧 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 3组的牙周状况

3组的牙周检查结果见表1。由表1可见,3组PD的差异无统计学意义($P>0.05$),PPROM组和PROM组的PLI、SBI均高于对照组($P<0.05$),可以认为PPROM组和PROM组的牙龈炎症较对照组明显,牙周状况较差。

表1 3组的牙周检查结果

Tab 1 The periodontal test results of three groups

组别	PD/mm	SBI	PLI
PPROM	2.31±0.48	2.35±0.86*	1.99±0.64*
PROM	2.28±0.29	2.42±0.49*	1.87±0.71*
对照组	2.27±0.39	1.53±0.84	1.39±0.90

注: *与对照组比较, $P<0.05$ 。

2.2 MMP-9在各组胎膜中的表达

MMP-9阳性信号定位于羊膜上皮细胞和绒毛膜细胞的细胞质,在PPROM组、PROM组可见不同程度的阳性表达(图1、2),对照组胎膜未见表达或可见弱阳性表达(图3、4)。3组中羊膜和绒毛膜MMP-9的表达强度见表2。由表2可见,3组间表达的差异均有统计学意义($P<0.05$),进一步行两两比较,PPROM组和PROM组间的差异没有统计学意义,但与对照组相比均有统计学意义,可以认为PPROM组和PROM

组的MMP-9表达强度高于对照组。

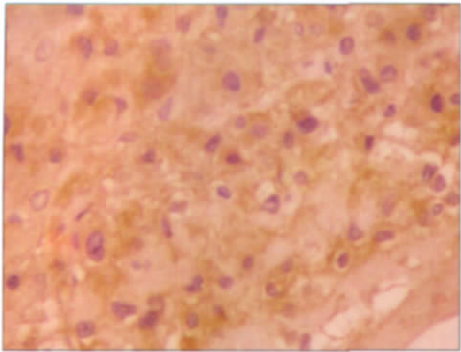


图 1 MMP-9在绒毛膜的强阳性表达 SP ×400
Fig 1 The strong positive expression of MMP-9 in chorion SP ×400

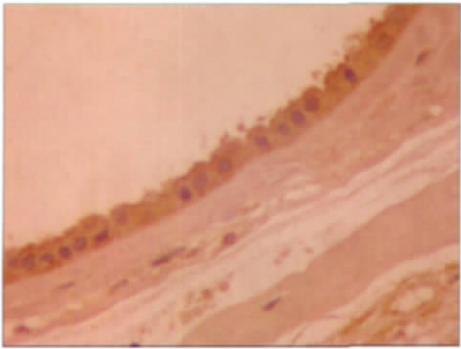


图 2 MMP-9在羊膜的强阳性表达 SP ×400
Fig 2 The strong positive expression of MMP-9 in amniotic membrane SP ×400

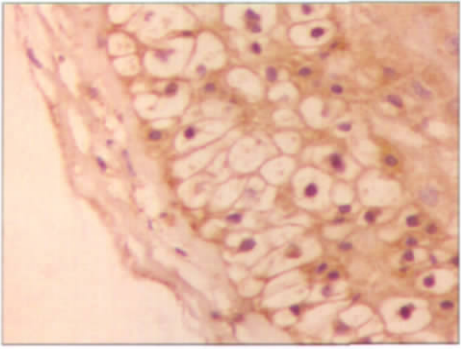


图 3 MMP-9在绒毛膜的弱阳性表达 SP ×400
Fig 3 The weak positive expression of MMP-9 in chorion SP ×400



图 4 MMP-9在羊膜的弱阳性表达 SP ×400
Fig 4 The weak positive expression of MMP-9 in amniotic membrane SP ×400

表 2 3组胎膜中MMP-9的表达强度

Tab 2 The expression of MMP-9 in three groups

组别	部位	
	绒毛膜	羊膜
PPROM	0.29±0.015	0.28±0.012
PROM	0.27±0.013	0.29±0.009
对照组	0.22±0.005	0.20±0.014

2.3 牙周状况与MMP-9表达的相关性分析

绒毛膜中MMP-9表达与PD没有相关性($r=0.053$, $P=0.075$), 与SBI呈正相关($r=0.433$, $P<0.05$), 与PLI呈正相关($r=0.310$, $P<0.05$)。羊膜中MMP-9表达与PD没有相关性($r=0.077$, $P=0.597$), 与SBI呈正相关($r=0.430$, $P<0.05$), 与PLI呈正相关($r=0.324$, $P<0.05$)。由此可见, 当SBI和PLI较高, 即牙周状况较差时, 孕妇胎膜MMP-9表达量较高。

3 讨论

胎膜由羊膜和绒毛膜组成, 主要成分包括 、 、 、 型胶原, 蛋白多糖, 糖胺多糖, 弹力纤维等。胎膜基底膜的主要成分是 型胶原, 其完整性的破坏是由于 型胶原含量降低所致^[4]。

MMP是一组具有许多共同生化性质, 参与降解包括骨在内的全身各种组织细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的一组蛋白酶。在组织重建, 包括胚胎发育、骨组织改建、血管新生等过程中发挥着重要的生理作用。MMP几乎能降解所有的ECM, 其中MMP-2和MMP-9均属明胶酶, 有着相同的作用底物, 即明胶, 、 、 型胶原, 纤维连接蛋白和弹性蛋白等^[5]。

几乎所有的MMP与感染均有一定的关联, 即患者存在感染时, MMP上升。机体的炎症反应可使许多细胞因子如白细胞介素和肿瘤坏死因子等分泌增加, 诱导产生MMP或激活蛋白酶(主要是MMP)从而降解ECM。MMP-9的升高受很多因素影响, 其表达可能由生长因子、炎性细胞因子、癌基因产物等诱导。

牙周疾病是育龄期妇女常见的口腔疾患^[6]。妊娠期间由于激素水平升高, 牙龈对局部的刺激反应增强, 加重了牙菌斑引起的炎症反应。本研究通过检查PD、SBI和PLI来反映孕妇的牙周状况, 结果发现发生PROM孕妇的牙周状况较未发生PROM者差。

牙周炎是侵犯牙龈和牙周支持组织的慢性炎症性破坏性疾病, 其特征性病变包括牙齿的支持结构, 即ECM中的牙周胶原纤维的破坏。牙周炎症可能是一个尚未被认识的导致PROM的因素。发生感染

时,由于炎性细胞因子白细胞介素-1 β 、白细胞介素-8、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子及花生四烯酸代谢产物可刺激多形核白细胞释放MMP,活化的MMP能降解胶原导致胎膜破裂。正常妊娠状况下,胎膜的完整性始终维持不变,其原因可能与低水平的MMP-9和相对较高水平的金属蛋白酶组织抑制剂(tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP)-1共同作用有关。Maymon等^[7]发现:MMP-9在羊水水平随妊娠进展而发生变化,在孕中期甚微,但在分娩、破膜、羊膜腔感染的羊水中明显升高,随着妊娠的进展,其水平可达产前2~4倍。在某些因素如感染等作用下,MMP-2和MMP-9调控失衡,表达过度增高,胎膜中的胶原等ECM降解加快,胎膜强度和韧性降低,不能承受正常的宫腔压力,导致胎膜在临产前发生了破裂^[8-9]。

研究^[10-11]发现:PROM孕妇与足月分娩及早产孕妇相比,羊水MMP-2、MMP-9升高,尤其MMP-9明显升高。MMP-9在早产PROM和足月PROM孕妇胎膜中的表达明显高于足月临产组,说明MMP-9在PROM中有重要的作用。本研究也发现,MMP-9阳性信号表达于羊膜上皮细胞和绒毛膜细胞的细胞质,且在PPROM和PROM组中均可见不同程度的表达,对照组中未见表达或仅见弱阳性表达,这表明MMP-9是降解胎膜的重要物质,与上述研究的结果一致。

Soell等^[12]研究表明:牙周炎患者龈沟液中MMP-9的水平明显高于牙周正常者。牙龈炎症时,龈沟液、唾液中均能检测到MMP-1、MMP-3、MMP-8、MMP-2、MMP-9的活性增加,且随牙龈炎症程度加重,其酶活性及其产物增多^[13]。Séguier等^[14]的研究指出,MMP-9可以作为牙周炎临床严重程度的一个指标。本研究发现,绒毛膜中MMP-9表达与SBI、PLI呈正相关,提示牙周病原微生物可能通过机体的炎症反应使许多细胞因子如白细胞介素、肿瘤坏死因子等分泌增加,诱导胎膜部位MMP-9产生或激活,降解ECM导致胎膜破裂。

牙周炎症引起PROM的具体机制及预防方法,检测孕妇血液或尿液中的MMP-9水平是否有助于预测PROM的发生仍有待作进一步的研究。

[参考文献]

[1] 乐杰. 妇产科学[M]. 7版. 北京:人民卫生出版社, 2007:137-138.
YUE Jie. Obstetrics and gynecology[M]. 7th ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2007:137-138.
[2] 卞金有. 预防口腔医学[M]. 4版. 北京:人民卫生出版社, 2004:32-33.

BIAN Jin-you. Preventive dentistry[M]. 4th ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2004:32-33.
[3] 曹采方. 牙周病学[M]. 4版. 北京:人民卫生出版社, 2003:4-33.
CAO Cai-fang. Periodontics[M]. 4th ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2003:4-33.
[4] Malak TM, Ockleford CD, Bell SC, et al. Confocal immunofluorescence localization of collagen types α 1(I), α 2(I), α 1(III), and α 2(III) and their ultrastructural organization in term human fetal membranes [J]. Placenta, 1993, 14(4):385-406.
[5] Massova I, Kotra LP, Fridman R, et al. Matrix metalloproteinases: Structures, evolution, and diversification[J]. FASEB J, 1998, 12(12):1075-1095.
[6] 张静萍, 池学谦, 张金廷. 龈沟液及酶水平的变化与牙周病[J]. 现代口腔医学杂志, 2000, 14(6):419-420.
ZHANG Jing-ping, CHI Xue-qian, ZHANG Jin-ting. The variations of GCF and enzyme levels in patients with periodontal disease[J]. J Modern Stomatol, 2000, 14(6):419-420.
[7] Maymon E, Romero R, Pacora P, et al. Evidence for the participation of interstitial collagenase(matrix metalloproteinase 1) in preterm premature rupture of membranes[J]. Am J Obstet Gynecol, 2000, 183(4):914-920.
[8] Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. Amniochorion gelatinase-gelatinase inhibitor imbalance *in vitro*: A possible infectious pathway to rupture[J]. Obstet Gynecol, 2000, 95(2):240-244.
[9] Schönbeck U, Mach F, Libby P. Generation of biologically active IL-1 β by matrix metalloproteinases: A novel caspase-1-independent pathway of IL-1 β processing[J]. J Immunol, 1998, 161(7):3340-3346.
[10] Locksmith GJ, Clark P, Duff P, et al. Amniotic fluid concentrations of matrix metalloproteinase 9 and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 during pregnancy and labor[J]. Am J Obstet Gynecol, 2001, 184(2):159-164.
[11] Vadillo-Ortega F, Hernandez A, Gonzalez-Avila G, et al. Increased matrix metalloproteinase activity and reduced tissue inhibitor of metalloproteinases-1 levels in amniotic fluids from pregnancies complicated by premature rupture of membranes[J]. Am J Obstet Gynecol, 1996, 174(4):1371-1376.
[12] Soell M, Elkaïm R, Tenenbaum H. Cathepsin C, matrix metalloproteinases, and their tissue inhibitors in gingiva and gingival crevicular fluid from periodontitis-affected patients[J]. J Dent Res, 2002, 81(3):174-178.
[13] 金钊, 段银钟, 李潇. 大鼠牙齿移动过程中牙周组织中基质金属蛋白酶-2的表达和分布[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2001, 11(3):157-159.
JIN Fang, DUAN Yin-zhong, LI Xiao. Expression and distribution of MMP-2 in the periodontal tissues of rats during tooth movement[J]. Chin J Conserv Dent, 2001, 11(3):157-159.
[14] Séguier S, Gogly B, Bodineau A, et al. Is collagen breakdown during periodontitis linked to inflammatory cells and expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human gingival tissue[J]. J Periodontol, 2001, 72(10):1398-1406.

(本文编辑 胡兴戎)