

功能性矫治器引导下颌前伸后咀嚼肌中基质金属蛋白酶抑制因子及IV型胶原参与咀嚼肌的适应性变化*☆

孙慧玲¹, 周洪², 邹敏²

Expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases and type IV collagen in growing rat masticatory muscle after functional mandibular protrusion

Sun Hui-ling¹, Zhou Hong², Zou Min²

Abstract

BACKGROUND: Rat masticatory muscle presented with adaptability and remodeling during functional mandibular protrusion, and matrix metalloproteinases was involved in this process.
OBJECTIVE: To investigate tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMPs) and collagen type IV changes in growing rat masticatory muscle after functional mandibular protrusion.
METHODS: Healthy male Sprague Dawley rats, aged 4 weeks, were randomly divided into the experimental and control groups. Rats in the experimental group wear appliance 10–12 hours per day. The expressions of TIMP-1, TIMP-2 and type IV collagen in growing rat masticatory muscle were measured at 3, 7, 14 and 21 days by immunohistochemistry.
RESULTS AND CONCLUSION: TIMP-1, TIMP-2 and type IV collagen were expressed in digastric muscle in all groups. However, compared with the control group, the expression of TIMP-1, TIMP-2 and type IV collagen was enhanced in the experimental group, which suggested that, TIMP-1, TIMP-2 and collagen type IV involve changes in growing rat masticatory muscle after functional mandibular protrusion.

Sun HL, Zhou H, Zou M. Expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases and type IV collagen in growing rat masticatory muscle after functional mandibular protrusion. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(41):7661-7664. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 功能性矫治器引导大鼠下颌矫形治疗中, 咀嚼肌也会发生适应性变化和改建, 基质金属蛋白酶参与其中变化。
目的: 观察功能性矫治器引导大鼠下颌前伸后咀嚼肌中基质金属蛋白酶抑制因子及其底物作用蛋白IV型胶原表达。
方法: 4周龄健康雄性SD大鼠随机分为实验组和对照组。实验组每日白天戴矫治器10~12h。采用免疫组织化学方法观察戴矫治器后3, 7, 14, 21d大鼠二腹肌前腹中基质金属蛋白酶抑制因子1, 2及IV型胶原的表达。
结果与结论: 实验组和对照组大鼠二腹肌前腹中基质金属蛋白酶抑制因子1, 2及IV型胶原均有表达。但实验组IV型胶原、基质金属蛋白酶抑制因子1, 2表达明显增强, 表明功能性矫治器引导大鼠下颌前伸后咀嚼肌中基质金属蛋白酶抑制因子1, 2及IV型胶原参与了咀嚼肌的适应性变化。
关键词: 咀嚼肌; 基质金属蛋白酶抑制因子1; 基质金属蛋白酶抑制因子2; IV型胶原; 下颌前伸
doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.41.015

孙慧玲, 周洪, 邹敏. 功能性矫治器引导下颌前伸后咀嚼肌中基质金属蛋白酶抑制因子及IV型胶原参与咀嚼肌的适应性变化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(41):7661-7664. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

下颌骨的功能性矫形治疗, 是在生长发育期通过刺激患者的下颌骨生长, 以达到矫治下颌骨发育不足的目的。在引导下颌前伸的过程中, 除了骨组织在肌张力的作用下发生改建和生长外, 咀嚼肌也会发生相应的变化和改建, 以保持和稳定下颌骨生长的结果^[1-5]。但近些年来, 功能性矫治器的研究多集中在下颌骨的改建和生长上, 特别是髁状突的适应性改建及其影响因素, 而对咀嚼肌功能的适应性变化研究较少。课题前期的研究工作表明, 基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)在咀嚼肌的适应变化中发挥了一定的作用, 本实验

进一步观察基质金属蛋白酶抑制因子(tissue inhibitor of matrix metalloproteinases, TIMPs)及其作用底物IV型胶原也在这一过程中的作用。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 实验于2009-03/2010-04在西安交通大学医学院实验动物中心、人体解剖组织胚胎学实验室完成。

动物: 清洁级4周龄健康雄性SD大鼠80只, 体质量(70±5)g, 由西安交通大学医学院实验动物中心提供。饲养温度(22±2)℃, 光照时间12h(7:00~19:00), 自由饮水, 定时摄食。

¹Research Center for Stomatology,
²Department of Orthodontics, Stomatology Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China

Sun Hui-ling☆, Studying for doctorate, Attending physician, Research Center for Stomatology, Stomatology Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China sunhui@mail.xjtu.edu.cn

Correspondence to: Zhou Hong, Professor, Department of Orthodontics, Stomatology Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China

Supported by: the Tackle Key Program in Science and Technology of Shaanxi Province, No. 2006k11-G6(2)*

Received: 2010-07-23
Accepted: 2010-08-26

西安交通大学, 医学院附属口腔医院, ¹口腔医学研究中心, ²正畸科, 陕西省西安市 710004

孙慧玲☆, 女, 1965年生, 河南省巩义市人, 汉族, 西安交通大学在读博士, 主治医师, 主要从事颌面颌生长发育形态与功能的关系方面的研究。
sunhuil@mail.xjtu.edu.cn

通讯作者: 周洪, 教授, 西安交通大学医学院附属口腔医院正畸科, 陕西省西安市 710004
zhouhong@mail.xjtu.edu.cn

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2010)41-07661-04

收稿日期: 2010-07-23
修回日期: 2010-08-26 (20100723006/YJ-Z)

实验过程中对动物的处置符合中华人民共和国科技部2006年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》标准^[6]。

试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
兔抗人/小鼠/大鼠 TIMP-1 抗体,	北京中杉金桥生物技术有限公司
兔抗人/小鼠/大鼠 TIMP-2 抗体,	
兔抗人/小鼠/大鼠IV型胶原抗体,	
即用型 SABC 试剂盒, DAB 显色试剂盒	
多聚甲醛	西安化学试剂厂
多聚赖氨酸	美国 Sigma 公司
DM4000B 普通光学显微镜,	德国 Leica 公司
Qwin500cw 图像信号采集与分析	

方法:

分组: 大鼠随机分为对照组和实验组, 各40只。

模型的建立: 矫治器参照文献[7]使用的矫治器并加以改良, 由塑料底板、斜面导板和口外固位臂三部分组成。斜面导板为6 mm×8 mm带环片, 斜面导板与上颌咬合平面成20°~25°。矫治器戴于实验组大鼠上切牙, 为防止矫治器脱落, 用橡皮圈固位于大鼠鼻上颌复合体。当大鼠闭口进行功能运动时, 下切牙咬在斜面导板上, 下颌被引导前伸。实验组大鼠每日白天戴矫治器10~12 h。

标本制备: 分别于建模后3, 7, 14, 21 d, 每组各取10只大鼠颈部脱臼处死。

取右侧二腹肌前腹浸于现配的40 g/L多聚甲醛液固定12 h, 常规脱水, 透明, 石蜡包埋。

每块组织作连续切片7张, 片厚5 μm, 1张作苏木精-伊红染色, 其他6张作免疫组化染色。

免疫组化: 取上述标本, 常规脱蜡至水、灭活内源性酶、微波修复、滴加胎牛蛋白5%封闭液、一抗4℃过夜孵育、二抗室温孵育、滴加SABC, 室温孵育。DAB显色液显色。常规脱水透明封片。

图像分析: 利用图像信号采集与分析系统对大鼠二腹肌中TIMP-1, TIMP-2, IV型胶原阳性部位的透光强度进行灰度值的测定。每张组织片随机选3个视野进行测量, 结果取其平均值。

主要观察指标: 免疫组化法测定实验组和对照组二腹肌前腹中TIMP-1, 2, IV型胶原的表达情况。

设计、实施、评估者: 设计为第二作者, 实施为第一、第三作者, 评估为第一、第二作

者, 经过正规培训, 采用盲法评估。

统计学分析: 采用SPSS 16.0 统计软件(美国SPSS公司)对灰度值进行方差分析及独立样本t 检验。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 大鼠80只全部进入最终分析。

2.2 咀嚼肌中TIMP-1的表达 在建模后14, 21 d, 实验组明显比对照组TIMP-1表达增强(P < 0.05), 见图1, 表1。

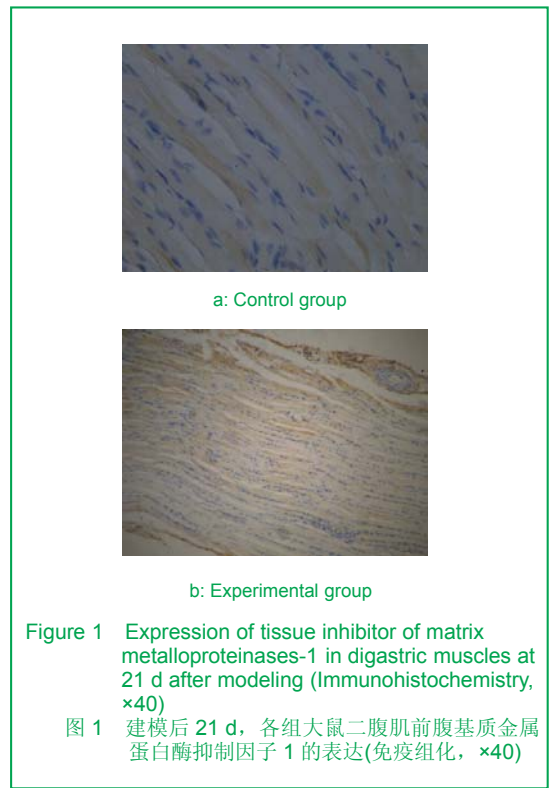
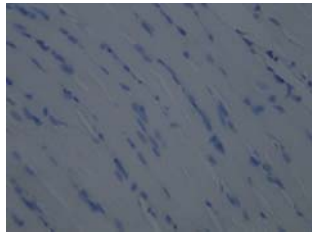


表1 各组大鼠不同时间咀嚼肌基质金属蛋白酶抑制因子1表达结果

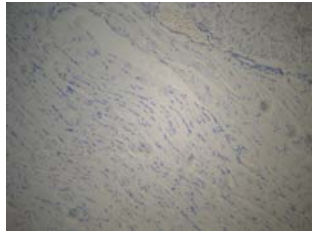
Table 1 Expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 in masticatory muscles at different time points (x±s, n=10, gray scale)

Time after modeling (d)	Experimental group	Control group	P
3	168.59±2.60	169.61±7.37	0.757
7	166.31±5.31	171.49±3.07	0.066
14	168.72±3.49	175.13±3.38	0.009
21	168.11±2.26	173.62±4.11	0.016

2.3 咀嚼肌中TIMP-2的表达 建模7 d后, 实验组比对照组TIMP-2表达明显增强(P < 0.05), 见图2, 表2。



a: Control group



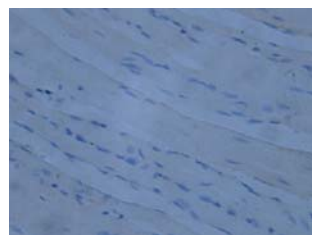
b: Experimental group

Figure 2 Expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-2 in digastric muscles at 21 d after modeling (Immunohistochemistry, $\times 40$)
图2 建模后 21 d, 各组大鼠咀嚼肌基质金属蛋白酶抑制因子 2 的表达(免疫组化, $\times 40$)

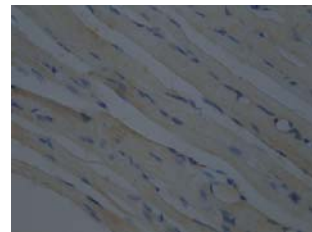
表2 各组大鼠不同时间咀嚼肌基质金属蛋白酶抑制因子 2 表达结果
Table 2 Expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-2 in masticatory muscles at different time points ($\bar{x}\pm s$, $n=10$, gray scale)

Time after modeling (d)	Experimental group	Control group	P
3	167.44 \pm 10.18	173.45 \pm 7.15	0.226
7	169.18 \pm 6.65	177.45 \pm 0.94	0.016
14	168.72 \pm 3.49	174.56 \pm 2.78	0.035
21	165.30 \pm 4.93	176.18 \pm 2.21	0.002

2.4 咀嚼肌中IV型胶原的表达 见图3, 表3。



a: Control group



b: Experimental group

Figure 3 Expression of type IV collagen in digastric muscles at 21 d after modeling (Immunohistochemistry, $\times 40$)
图3 建模后 21 d, 各组大鼠咀嚼肌IV型胶原的表达(免疫组化, $\times 40$)

表3 各组大鼠不同时间咀嚼肌IV型胶原表达图像分析灰度值结果
Table 3 Expression of type IV collagen in masticatory muscles at different time points ($\bar{x}\pm s$, $n=10$, gray scale)

Time after modeling (d)	Experimental group	Control group	P
3	148.84 \pm 9.05	154.18 \pm 6.35	0.226
7	150.38 \pm 5.91	157.74 \pm 0.83	0.016
14	149.98 \pm 3.10	155.17 \pm 2.47	0.035
21	146.94 \pm 4.38	156.60 \pm 1.96	0.002

建模7 d后, 实验组比对照组IV型胶原表达明显增强($P < 0.05$)。

3 讨论

骨骼肌适应性是以改变形态、生化特性和分子变化而改变骨骼肌肌纤维的功能属性为特征的^[7]。在众多的分子变化中, 目前研究较多的是MMPs/TIMPs系统。本课题组的前期工作已经表明MMPs(MMP-1, MMP-2)无论在mRNA水平还是在蛋白水平参与了功能性矫治器前伸下颌过程中咀嚼肌改建的过程。而TIMPs是MMPs活性的重要内源性调节因子。

本实验发现, 在正常大鼠咀嚼肌(二腹肌前腹)肌纤维细胞IV型胶原、TIMP-1, TIMP-2均阳性表达, 证明咀嚼肌在生理状态下处于不断改建的动态平衡之中, 而ECM的正常代谢是维持咀嚼肌形态的基础。当下颌功能性前伸后, 这种平衡被打破。当戴功能性矫治器IV型胶原、TIMP-2, TIMP-1表达增强, 表明TIMP-1, TIMP-2及IV型胶原参与咀嚼肌重塑改建过程, 影响细胞外基质的代谢。这与文献^[8-12]的观察一致。同时也与作者前期研究中MMP-2, MMP-9的变化趋势一致^[13-15], 说明MMPs/TIMP这个平衡体系在此过程中发挥了作用, 并且其作用底物IV型胶原也参与了这个变化过程。

4 参考文献

- Song YP, Zhou XK, Chen MS. Shiyong Kouqiang Yixue Zazhi. 1998;14(3):169-171. 宋一平, 周秀坤, 陈孟诗. 功能性矫治器引导下颌前伸对其咀嚼肌生物力学特性的影响[J]. 实用口腔医学杂志, 1998, 14(3):169-171.
- Wang X, Luo SJ, Yang JY. Kouqiang Zhengjixue. 1995;2(3): 100-101. 王昕, 罗颂椒, 杨俊业, 等. 功能矫形前伸下颌后大鼠翼外肌和浅层嚼肌活动的实验研究[J]. 口腔正畸学, 1995, 2(3):100-101.
- Wang X, Luo SJ, Yang MZ. Huaxi Kouqiang Yixue Zazhi. 1994; 12(4):303-305. 王昕, 罗颂椒, 杨名仲. 矫形力对咀嚼肌结构影响的研究[J]. 华西口腔医学杂志, 1994; 12(4):303-305.
- Chen KY, Luo SJ. Sichuan Yixue. 2002;23(3):244-245. 陈开云, 罗颂椒. 功能矫形对大鼠翼外肌细胞膜乙酰胆碱受体最大结合容量影响的研究[J]. 四川医学, 2002, 23(3):244-245.
- Song YP, Zhou XK. Zhonghua Kouqiang Yixue Zazhi. 1998;33(4): 230-232. 宋一平, 周秀坤. 功能性矫治器打开大鼠下颌对咀嚼肌生物力学特性的影响[J]. 中华口腔医学杂志, 1998, 33(4):230-232.
- The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals. 2006-09-30. 中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30.

[7] Thompson LV. Skeletal muscle adaptations with age, inactivity, and therapeutic exercise. *J Orthop Sports Phys Ther.* 2002;32(2):44-57.

[8] Singh A, Nelson-Moon ZL, Thomas GJ, et al. Identification of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors type 1 and 2 in human masseter muscle. *Arch Oral Biol.* 2000;45(6):431-440.

[9] Ahtikoski AM, Koskinen SO, Virtanen P, et al. Synthesis and degradation of type IV collagen in rat skeletal muscle during immobilization in shortened and lengthened positions. *Acta Physiol Scand.* 2003;177(4):473-481.

[10] Koskinen SO, Kjaer M, Mohr T, et al. Type IV collagen and its degradation in paralyzed human muscle: effect of functional electrical stimulation. *Muscle Nerve.* 2000;23(4):580-589.

[11] Ahtikoski AM, Koskinen SO, Virtanen P, et al. Synthesis and degradation of type IV collagen in rat skeletal muscle during immobilization in shortened and lengthened positions. *Acta Physiol Scand.* 2003;177(4):473-481.

[12] Lo IK, Marchuk LL, Hollinshead R, et al. Matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase mRNA levels are specifically altered in torn rotator cuff tendons. *Am J Sports Med.* 2004;32(5):1223-1229.

[13] Sun HL, Zhou H, Zou M. Xi'an Jiaotong Daxue Xuebao: Yixue Ban. 2006;27(1):86-89.
孙慧玲,周洪,邹敏.功能性矫治器引导大鼠下颌前伸后咀嚼肌基质金属蛋白酶mRNA的表达[J].西安交通大学学报:医学版, 2006,27(1):86-89.

[14] Sun HL, Zhou H, Zou M. Xiandai Kouqiang Yixue Zazhi. 2006;20(6): 18-620.
孙慧玲,周洪,邹敏.功能矫治器引导大鼠下颌前伸咀嚼肌中MMPs表达[J].现代口腔医学杂志, 2006,20(6):618-620.

[15] Zhou H, Sun HL, Zou M. Linchuang Kouqiang Yixue Zazhi. 2007;23(2):84-86.
周洪,孙慧玲,邹敏.功能性矫治器引导大鼠下颌前伸后二腹肌中金属蛋白酶的表达研究[J].临床口腔医学杂志, 2007,23(2):84-86.

[16] Lo IK, Marchuk LL, Hollinshead R, et al. Matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase mRNA levels are specifically altered in torn rotator cuff tendons. *Am J Sports Med.* 2004;32(5):1223-1229.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 陕西省科技攻关项目(2006k11-G6(2)), 功能矫形前伸下颌后大鼠咀嚼肌 TIMPs 及 IV 胶原表达变化研究。

致谢: 感谢西安交通大学医学院人体解剖组织胚胎实验室李明老师在免疫组织化学实验过程中提供的技术性帮助; 感谢西安交通大学医学院统计教研室王全丽老师给

予的指导; 感谢西安交通大学口腔医院病理科齐红提供的方便。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

课题的意义: 课题提供下颌前伸过程中咀嚼肌适应性变化的生物学机制的理论依据, 以便指导临床应用, 并因此得到陕西省科技攻关项目的基金资助。

课题评估的“金标准”: 本次实验应用免疫组化方法定量蛋白质表达相对准确。

设计或课题的偏倚与不足: 课题设计还应观察中枢相关核团的变化。实施过程中未完成半定量的蛋白分析如 Western blot, mRNA 水平的变化实验, 后续工作还要继续完成。

提供临床借鉴的价值: 本课题成果为临床的治疗提供了理论依据。

外国专家修饰的医学英语句型: 本刊英文部

中文	润色前	润色后
轴突末端	axonal terminal	axon terminal
问句的处理	Whether the astrocytes abundant in the dopaminergic neuronal body and neuronal axonal endings in the ventral tegmental area (VTA) and SNC have the same reactivity in a mouse model of MPTP-induced Parkinson's disease (PD)?	It is unknown whether the astrocytes surrounding dopaminergic neuronal cell bodies and axon terminals in the ventral tegmental area (VTA) show the same reactivity as those in the SNC in mouse models of MPTP-induced Parkinson's disease (PD).
具有自身分化增殖能力的	Neural stem cells have been shown capable to self-differentiate and self-proliferate and primarily residing in the subependymal region and the dentate gyrus of adult brains.	Neural stem cells, with the capacity to proliferate and differentiate into neurons and glia, primarily reside in the subependymal region and the dentate gyrus of the adult mammalian brain
适量的	for instance, proper amount of bFGF can maximize the proliferation effects, contributing to post-ischemic neural repair	For instance, appropriate amounts of bFGF can maximize neural stem cell proliferation and contribute to post-ischemic neural repair.