

人牙冠及根部牙本质内基质金属蛋白酶8, 20的测定及分析**☆◆

朱梓园, 周 恬, 张保卫

Characterization and analysis of matrix metalloproteinases 8 and 20 in the human crown and root dentin

Zhu Zi-yuan, Zhou Tian, Zhang Bao-wei

Department of Prosthodontics, Shanghai Key Laboratory of Stomatology, College of Stomatology, the Ninth People's Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200011, China

Zhu Zi-yuan*, Doctor, Attending physician, Department of Prosthodontics, Shanghai Key Laboratory of Stomatology, College of Stomatology, the Ninth People's Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200011, China
yuan1588@hotmail.com

Corresponding author: Zhang Bao-wei, Chief physician, Department of Prosthodontics, Shanghai Key Laboratory of Stomatology, College of Stomatology, the Ninth People's Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200011, China
baoweizhang18@msn.com

Supported by: the Grant from Shanghai Science and Technology Committee, No. 08DZ22271100*; Major (Special) Subject Construction of Shanghai, No. T0202*

Received: 2011-12-01
Accepted: 2012-01-13

Abstract

BACKGROUND: In recent years, matrix metalloproteinases (MMP)-mediated collagen degradation in dentin has been widely studied. Recent studies have shown that MMPs play an important role in the progress of periodontal disease, dentin caries, pulpitis and failure in dentin adhesive interface.

OBJECTIVE: To determine the contents and distribution features of MMP-8 and -20 in the human crown and root dentin.

METHODS: Dentin powder was extracted by guanidine hydrochloride, then subjected to ethylene diamine tetraacetic acid demineralization in four cycles, and finally extracted by guanidine hydrochloride again. Extracts were analyzed by Western blot and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for MMP-8 and -20 detection.

RESULTS AND CONCLUSION: MMP-8 and MMP-20 in the extracted materials were confirmed by western blot and ELISA. MMP-8 and -20 were mostly extracted from the mineralized compartment of the dentin (E1). These two MMPs presented overall lower levels in G1 and the lowest levels in G2. Both Western blot analysis and ELISA detected that MMP-8 and -20 equally distributed in the crown and root dentin. MMP-8 and MMP-20 proteins have been found in the extracted materials from the human crown and root dentin. They are mostly presented in mineralized dentin, both in the crown and root dentin.

Zhu ZY, Zhou T, Zhang BW. Characterization and analysis of matrix metalloproteinases 8 and 20 in the human crown and root dentin. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(24): 4526-4529. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 基质金属蛋白酶被激活后可降解细胞外基质, 其对牙本质胶原的破坏对于牙周病、牙本质龋病、牙髓炎的进展及牙本质黏结的失败有重要影响。

目的: 检测冠根部牙本质内基质金属蛋白酶的含量及其分布特点。

方法: 牙本质经盐酸胍提取, 然后经 EDTA 循环脱矿, 再经盐酸胍提取。采用免疫印迹与免疫酶联吸附反应检测提取物中基质金属蛋白酶 8, 20 的含量, 对比二者在牙冠部和牙根部内的分布特点。

结果与结论: 免疫印迹结果及免疫酶联吸附检测结果均显示, 提取物中含有基质金属蛋白酶 8, 20。未矿化牙本质提取蛋白 G1 中基质金属蛋白酶 8, 20 含量较低, EDTA 反复提取矿化牙本质蛋白 E1 中含量较高, 脱矿后提取蛋白 G2 中 2 种基质金属蛋白酶的含量最低。基质金属蛋白酶 8, 20 在牙冠和牙根部表达量基本类似。提示冠根部牙本质中含有基质金属蛋白酶 8, 20, 它们大多存在于矿化牙本质中, 其在牙根和牙冠中的含量基本类似。

关键词: 基质金属蛋白酶 8; 基质金属蛋白酶 20; 牙本质; 免疫印迹法; 免疫酶联吸附反应

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.24.032

缩略语: MMPs: matrix metalloproteinases, 基质金属蛋白酶

朱梓园, 周 恬, 张保卫. 人牙冠及根部牙本质内基质金属蛋白酶 8, 20 的测定及分析[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(24):4526-4529. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)是一种水解细胞外基质的蛋白裂解酶,

包括基质中以及整合于质膜中的各种胶原酶和弹性蛋白酶等, 能降解几乎所有的细胞外基质蛋白以及许多非结构性蛋白^[1-2]。研究表明MMPs在牙周病、牙本质龋病、牙髓炎的进展中发挥重要的作用^[3-4]。

近年来, 有学者提出部分MMPs在含水环境中, 可导致牙本质-树脂界面混合层的胶原纤维结构发生变化^[5], 从而对树脂与牙本质的黏结强度产生影响^[6-7]。目前认为人牙本质基质中主要存在明胶酶MMP-2, 9^[8]。其他如间质胶原酶MMP-8和MMP-20以及基质溶解酶MMP-3等在牙本质中的含量及活性尚未得到明确结论^[9-10]。

近来对于牙冠部牙本质中MMPs含量、分布及活性的报道较多, 而对于其在牙根部牙本质中表达的研究较少^[11-12]。有报道称因为牙冠部和牙根部的牙本质构成的差异或可导致冠根部牙本质内MMPs的含量和活性不同^[13-14]。本实验通过制取牙本质粉, 检测冠根部牙本质中的MMP-8, 20的含量, 为分析牙本质内MMPs对树脂黏结的影响提供理论基础^[15]。

1 材料和方法

设计: 免疫分析实验。

时间及地点: 于2011-06/11在上海市第九人民医院口腔修复科及上海市口腔医学重点实验室完成。

材料: 收集上海交通大学医学院附属第九人民医院口腔颌面外科拔除的30颗健康第三磨牙作为观察对象, 30例患者中男15例, 女15例, 年龄20~30岁, 无全身性疾病, 牙齿无龋, 无釉质发育不全, 无牙周病。患者对检查方案均知情同意, 且得到医院伦理委员会批准。

主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
蛋白酶抑制剂	Sigma, 美国
兔抗人 MMP-8, 20 单克隆抗体	Bioworld, 美国
蛋白质分子质量标准	Fermantas, 加拿大
免疫酶联吸附反应试剂盒	R&D, 美国
打磨机	Cryomill, Retsch, Haan, 德国
冷冻干燥机	Benchtop, 美国
多功能酶标仪	Tecan M1000, 瑞士

材料:

实验分组和标本处理: 牙齿拔出后, 迅速置PBS中保存。在釉牙骨质界截为冠、根两部分, 即牙冠牙本质组及牙根牙本质组。去除牙髓组织, 磨除牙骨质和牙釉质。处理后的冠根部牙

本质块在液氮-70℃冰冻3 min。然后冠根组分别用打磨机磨成牙本质粉。-20℃保存^[16]。

提取牙本质蛋白:

收集未脱矿的蛋白(G1提取物): 牙冠组和牙根组的牙本质粉(每份2 g)在4℃环境下经2.5 mol/L NaCl振荡过夜以去除杂质。纯化后的牙本质粉用蒸馏水冲洗2次。然后加入盐酸胍溶液(4 mol/L盐酸胍, 65 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4)中连续振荡2次, 每次48 h。溶液中加入蛋白酶抑制剂。离心2 000 r/min, 10 min, 取上清液透析, 冷冻干燥, 收集未脱矿的蛋白, -20℃冰冻保存。

收集与矿化有关的蛋白(E1提取物): 经上步盐酸胍处理离心后沉淀的牙本质粉用0.5 mol/L EDTA, pH 7.4脱矿, 每96 h更换溶液, 循环4次, 离心, 透析, 冷冻干燥, 收集与矿化有关的蛋白。

收集脱矿后的蛋白(G2提取物): 经EDTA脱矿后离心沉淀的牙本质粉再次经盐酸胍处理, 收集脱矿后的蛋白^[17]。

BCA蛋白浓度测定法测量每一步中提取物的总蛋白浓度见表1。

表1 每一步中提取物的总蛋白浓度 Table 1 Total protein concentration from extracts in each step		
Step	Crown	Root dentin
G1	0.166	0.234
E1	0.108	0.125
G2	0.223	0.253

牙本质中MMP-8, 20的检测:

免疫印迹(Western Blot): 准备冠根组的G1, E1, G2, 在离心管中与缓冲液混合, 置99℃水浴5 min, 配置聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE), 加入蛋白质电泳标准分子量及冠根组的G1, E1, G2, 电泳(250 V, 70 min), 转膜(50 V, 250 mA, 2 h)。将膜置于杂交袋内, 加入封闭液, 并按1 000:1加入兔抗人MMP-8单克隆抗体MMP-8, 封闭后4℃置12 h。之后膜经洗涤, 加入稀释后的鼠抗兔第二抗体孵育1 h, ECL显色。同样步骤再加入单克隆抗体MMP-20检测。

免疫酶联吸附反应检测: 采用免疫酶联吸附反应试剂盒。用免疫酶联吸附反应双抗夹心法检测MMP-8, 20在牙齿中不同部位的含量。取出冻存的提取蛋白样本, 室温下解冻。10 000 r/min离心10 min, 取出滤纸条, 静置备用。按说明

上海交通大学医学院附属第九人民医院口腔修复科, 上海市口腔医学重点实验室, 上海市 200011

朱梓园☆, 女, 1975年生, 上海市人, 汉族, 2005年上海第二医科大学毕业, 博士, 主治医师, 主要从事口腔生物材料研究。
yuan1588@hotmail.com

通讯作者: 张保卫, 主任医师, 上海交通大学医学院附属第九人民医院口腔修复科, 上海市口腔医学重点实验室, 上海市 200011
baoweizhang18@msn.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2012)24-04526-04

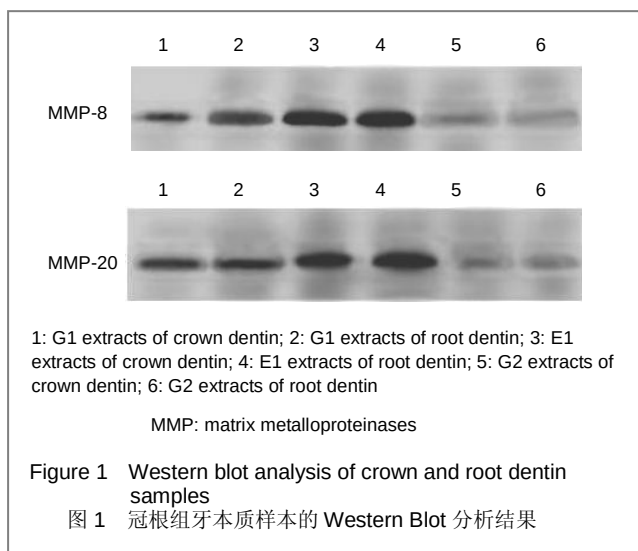
收稿日期: 2011-12-01
修回日期: 2012-01-13
(20110908008/G·W)

书配制洗涤液、工作液及进行操作测试。用多功能酶标仪450 nm测得每个孔的吸光度值。以系列标准品作标准曲线, 根据标准曲线得出每一孔MMP-8, 20的含量, 获得每一样本的浓度。

主要观察指标: MMP-8, 20在牙本质中的含量。

2 结果

2.1 免疫印迹结果 Western Blot 确认了MMP-8及MMP-20存在于冠根部牙本质, 两者的相对分子质量均在50 000左右, MMP-8及MMP-20在牙冠和牙根牙本质中表达较为相似, 见图1。



2.2 免疫酶联吸附反应结果 见表2。结果显示, 牙冠组和牙根组牙本质内均含有MMP-8和MMP-20, 其含量在牙冠和牙根部基本类似。G1提取蛋白中MMP-8, 20含量较低, E1中含量较高, 而G2中两种MMP-8, 20的含量较G1中更低, 差异有显著性意义($P < 0.05$)。

表2 基质金属蛋白酶8和基质金属蛋白酶20在牙齿不同部位的含量比较		
Table 2 Contents of matrix metalloproteinases (MMP)-8 and -20 in different dentin parts ($\bar{x} \pm s$, $n=30$, $\mu\text{g/L}$)		
Site	MMP-8	MMP-20
G1 of crown dentin	3.23 $\pm$ 1.73	5.05 $\pm$ 1.86
G1 of root dentin	5.46 $\pm$ 2.53	5.23 $\pm$ 3.24
E1 of crown dentin	28.36 $\pm$ 6.75 ^a	16.52 $\pm$ 5.12 ^a
E1 of root dentin	20.54 $\pm$ 7.05 ^a	21.65 $\pm$ 5.46 ^a
G2 of crown dentin	0.66 $\pm$ 0.28 ^a	1.32 $\pm$ 1.05 ^a
G2 of root dentin	1.13 $\pm$ 1.28 ^a	0.78 $\pm$ 0.52 ^a

^a $P < 0.05$, vs. G1 at the same site

3 讨论

成熟的牙本质细胞和牙髓组织中都存在MMPs, 在牙

本质形成过程中, 以酶原的形式钙化于牙本质中, 在某些特定情况下如细菌产酸和黏结酸蚀时会激活MMPs, 使其在牙本质龋和黏结界面降解过程中发挥重要作用^[18-19]。

MMPs家族中MMP-8主要由中性粒细胞产生, 能水解蛋白质, 破坏胶原纤维, 使结缔组织破坏、胶原降解^[20]。而MMP-20则参与了釉基质蛋白的降解过程^[21-22]。

在本文中采用Western Blot及免疫酶联吸附法检测证实了在冠部和根部的牙本质中均含有两种间质胶原酶MMP-8和MMP-20。MMP-8和MMP-20在E1中含量较高, 在经EDTA脱矿后提取的蛋白(G2)中的表达较弱, 提示此种酶经过EDTA反复脱矿已被基本提取。另外, 过低pH值可能会导致MMP的活性降低, 在G2中经EDTA反复脱矿后MMP-8和MMP-20可能被抑制。免疫酶联吸附反应检测结果与此结果相符, 显示牙冠部和牙根部牙本质提取的G2中MMP-20和MMP-8的含量非常低, 且数据较为不稳定。此结果提示, 这两种MMP大多存在于矿化的牙本质中, 酶活性的释放主要依赖于牙本质基质的脱矿, 如树脂黏结过程中的酸蚀反应^[23]。该结论与Sulkala等^[24]学者得出结论相似。不同的是, Sulkala等^[24]在未矿化牙本质提取蛋白G1中并未检测到MMP-20的存在, 而本实验在G1检测到微量MMP-8和MMP-20, 它们可能来源于成牙本质细胞分化过程的残余物或成牙本质细胞受到外界刺激后的释放物, 并存在于牙本质小管中, 或者松散的贴附在牙本质小管壁上。

由于牙本质中MMPs的存在, 对牙本质的表面处理可能会改变牙本质内MMPs的活性, 使其逐渐降解混合层底部的胶原纤维, 损害了混合层的完整性, 降低结接的耐久性^[25-26]。目前对牙冠部MMPs的研究相对较多。而根内牙本质内的MMPs同样可能受到影响, 如根内修复体黏结过程中使用酸蚀剂可能会激活牙本质源性的MMPs^[27]。

Santos等^[28]研究结果显示牙根部MMP-2含量高于相应的牙冠部MMP-2, 原因是由于牙根部牙本质矿化程度较牙冠部低, 因此使用EDTA后更易于从牙本质蛋白中提取。而本实验对MMP-8和MMP-20采用Western Blot检测结果显示, 无论在未矿化牙本质提取蛋白(G1)中, EDTA反复提取矿化牙本质蛋白(E1)还是脱矿后提取蛋白(G2)中, MMP-8和MMP-20在牙根和牙冠部牙本质中的表达基本相似, 均为G1中有表达, E1中表达较强, G2中表达微弱。免疫酶联吸附反应检测数据支持上述结果。

本实验通过免疫印迹和免疫酶联吸附反应, 证明了MMP-8和MMP-20存在于人冠、根部牙本质^[29]。并且其在牙根部牙本质中的分布及含量基本与在牙冠牙本质中类似, 桩核修复体黏结过程中某些因素可能影响牙本

质中MMPs活性从而促使牙本质胶原纤维降解^[30]。探讨并控制这些影响因素以提高修复体黏结的持久性将是今后的研究方向。

致谢: 感谢上海市口腔医学重点实验室。

4 参考文献

- [1] Skarja GA, Brown AL, Ho RK, et al. The effect of a hydroxamic acid-containing polymer on active matrix metalloproteinase. *Biomaterials*. 2009;30(10): 1890-1897.
- [2] Hannas AR, Pereira JM, Granjeiro JM, et al. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontol Scand*. 2007;65(1):1-13.
- [3] Sorsa T, Tjaderhane L, Salo T. Matrix metalloproteinase (MMP) in oral diseases. *Oral Dis*. 2004;10(6):311-318.
- [4] Palosaari H, Pennington CJ, Larmas M, et al. Expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in mature human odontoblasts and pulp tissue. *Eur J Oral Sci*. 2003;111(2):117-127.
- [5] Armstrong SR, Keller JC, Boyer DB, et al. The influence of water Storage and C-f. actor on the dentin-resin Composite microtensile bond strength and debond pathway utilizing a filled and unfilled adhesive resin. *Dent Mater*. 2001;17:268-276.
- [6] Erhardt MC, Osorio R, Toledano M. Dentin treatment with MMPs inhibitors does not alter bond strengths to caries-affected dentin. *J Dent*. 2008;36(12):1068-1073.
- [7] Moon PC, Weaver J, Brooks CN. Review of matrix metalloproteinases' effect on the hybrid dentin bond layer stability and chlorhexidine clinical use to prevent bond failure. *Open Dent J*. 2010;4:147-152.
- [8] Niu LN, Zhang L, Jiao K, et al. Localization of MMP-2, MMP-9, TIMP-1, and TIMP-2 in human coronal dentine. *J Dent*. 2011; 39(8):536-542.
- [9] Fanchon S, Bourd K, Septier D, et al. Involvement of matrix metalloproteinases in the onset of dentin mineralization. *Eur J Oral Sci*. 2004;112:171-176.
- [10] Garbisa S, Sartor L, Biggin S, et al. Tumor gelatinases and invasion inhibited by the green tea flavanol epigallocatechin-3-gallate. *Cancer*. 2001;91(4): 822-832.
- [11] Huang Y, A BL, Li B. *Kouqiang Yixue Yanjiu*. 2008;24(6): 622-624.
黄洋,阿伯拉,李博. MMP-8在龋病发展过程中的表达及意义[J]. 口腔医学研究,2008,24(6):622-624.
- [12] He CL, Wang F, Liu ZH, et al. *Huaxi Kouqiang Yixue Zazhi*. 2005;23(2):113-115.
贺长历,王锋,刘振华,等.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[J]. 华西口腔医学杂志,2005,23(2): 113-115.
- [13] Boushell LW, Kaku M, Mochida Y, et al. Immunohistochemical localization of matrix metalloproteinase-2 in human coronal dentin. *Arch Oral Biol*. 2008;53:109-116.
- [14] Palosaari H, Wahlgren J, Larmas M, et al. The expression of MMP-8 in human odontoblasts and dental pulpeell is down regn-luted by TGF-β1. *Dent Res*. 2000;79(1):77-84.
- [15] Hashimoto M, Ohno H, Kaga M, et al. In vivo degradation of resin-dentin bonds in humans over 1 to 3 years. *J Dent Res*. 2000;79:1385-1391.
- [16] Mazzoni A, Mannello F, Tay FR, et al. Zymographic analysis and characterization of MMP-2 and -9 forms in human sound dentin. *J Dent Res*. 2007;86(5):436-440.
- [17] Martin-De Las Heras S, Valenzuela A, Overall CM. The matrix metalloproteinase gelatinase A in human dentine. *Arch Oral Biol*. 2000;45(9):757-765.
- [18] Tjäderhane L, Larjava H, Sorsa T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *J Dent Res*. 1998;77(8):1622-1629.
- [19] Van Strijp AJ, Jansen DC, DeGroot J, et al. Host-derived proteinases and Degradation of dentine collagen in situ. *Caries Res*. 2003;37:58-65.
- [20] Ge LH, Shu R, Shen MH. *Shanghai Kouqiang Yixue*. 2008; 17(1):10-14.
葛琳华,束蓉,沈敏华.光动力疗法对慢性牙周炎患者龈沟液IL-1β和MMP-8含量的影响[J].上海口腔医学, 2008, 17(1):10-14.
- [21] Jing FQ, Wang Q, Liu TL, et al. *Huaxi Kouqiang Yixue Zazhi*. 2006;24(3) :199-201.
井枫秋,王强,刘天麟,等.过量氟对大鼠切牙基质金属蛋白酶-20及其组织抑制剂表达的影响[J].华西口腔医学杂志, 2006,24(3) : 199-201.
- [22] Shimada Y, Ichinose S, Sadr A, Localization of matrix metalloproteinases (MMPs-2, 8, 9 and 20) in normal and carious dentine. *Aust Dent J*. 2009;54(4):347-354.
- [23] Mazzoni A, Pashley DH, Nishitani Y, et al. Reactivation of inactivated endogenous proteolytic activities in phosphoric acid-etched dentine by etch-and-rinse adhesives. *Biomaterials*. 2006;27:4470-4476.
- [24] Sulkala M, Larmas M, Sorsa T, et al. The localization of matrix metalloproteinase-20 (MMP-20, enamelysin) in mature human teeth. *J Dent Res*. 2002;81(9):603-607.
- [25] Skarja GA, Brown AL, Ho RK, et al. The effect of a hydroxamic acid-containing polymer on active matrix metalloproteinase. *Biomaterials*. 2009;30(10):1890-1897.
- [26] Nishitani Y, Yoshiyama M, Wadgaonkar B, et al. Activation of Gelatinolytic/collagenolytic activity in dentin by self-etching adhesives. *Eur J Oral Sci*. 2006;114:160-166.
- [27] Jan DM, Atsushi M, Philippe E, et al, Enzymatic degradation of adhesive-dentin interfaces produced by mild self-etch adhesives. *Eur J Oral Sci*. 2010;118: 494-501.
- [28] Santos J, Carrilho M, Tervahartiala T, et al. Determination of matrix metalloproteinases in human radicular dentin. *J Endod*. 2009;35(5):686-689.
- [29] Sulkala M, Tervahartiala T, Sorsa T, et al. Matrix metalloproteinase-8(MMP-8) is the major collagenase in human dentin. *Arch Oral Biol*. 2007;52:121-127.
- [30] Tay FR, Pashley DH, Loushine RJ, et al. Self-etching adhesives increase collagenolytic activity in radicular dentin. *J Endod*. 2006;32:862-868.

来自本文课题的更多信息--

基金声明: 上海市科学技术委员会资助项目 (08DZ2271100); 上海市重点(特色)学科建设项目 (T0202)。

作者贡献: 实验设计者为朱梓园, 实验实施者为朱梓园、周恬, 论文审校者为张保卫, 朱梓园对文章负责。