

· 基础研究 ·

氦-氖激光对兔正畸牙移动牙周组织中基质金属蛋白酶-9 表达的影响

孙新华 林淑艳 曲冬

【摘要】目的 研究 He-Ne 激光照射对兔实验性牙移动牙周组织中基质金属蛋白酶-9(MMP-9)表达的影响,探讨 He-Ne 激光局部照射对促进正畸牙齿移动及牙周组织改建的可行性。**方法** 30 只大耳白兔,随机分为 6 组,每组 5 只,其中实验动物右侧为照射侧,左侧为对照侧。各组动物分别经正畸实验装置给予持续 1,3,5,7,14 及 21 d 的加力处理,同时实验动物右侧局部牙周组织给予 He-Ne 激光照射,左侧则不进行特殊处理。各组实验动物分别于实验结束后处死,对实验样本进行 MMP-9 免疫组织化学染色、图像分析,观察兔实验性牙移动牙周组织中 MMP-9 表达与分布的变化,并进行统计学分析。**结果** He-Ne 激光照射侧压力区与张力区 MMP-9 的表达增强现象均较对照侧出现得早,且峰值亦较对照侧高。张力区兔牙周组织中 MMP-9 表达灰度分析表明,术后第 5,7 天时,照射侧与对照侧间差异有显著性意义($P < 0.05$),压力区兔牙周组织中 MMP-9 表达灰度分析表明,术后第 3,5,7 天时,照射侧与对照侧间差异有显著性意义($P < 0.05$ 或 0.01)。**结论** He-Ne 激光照射增强了兔正畸牙周组织中 MMP-9 的表达,提示 He-Ne 激光照射促进了正畸牙移动过程中的血管化反应及骨改建过程。

【关键词】 氦-氖激光; 牙齿移动; 牙周组织; 基质金属蛋白酶

Effects of He-Ne irradiation on matrix metalloproteinases-9 expression during experimental tooth movement in rabbits SUN Xin-hua*, LIN Shu-yan, QU Dong. *Department of Orthodontics, School of Stomatology, Jilin University, Changchun 130041, China

【Abstract】 Objective To explore the feasibility of He-Ne laser irradiation in promoting orthodontic tooth movement and periodontal remodeling through observing the effect of low power laser on the expression and distribution of matrix metalloproteinases-9(MMP-9) during orthodontic tooth movement in rabbit. **Methods** Thirty rabbits were divided into 1d,3d,5d,7d,14d and 21d groups, each group were given a coil spring connected to the maxillary upper first molar to the upper incisor and fixed bilaterally by a ligature wire and set force to 80g. He-Ne laser irradiation was performed on the right side of the orthodontic tooth, and the left side served as control. Radiation time ranged from 1 day to 5 days, once a day, 15min each time. All of the tissue sections were proceeded with MMP-9 immunohistochemical staining. MMP-9 average gray scale in periodontal tissue of the orthodontic teeth was analyzed by a Computer Image Analyzing System. **Results** The expression level of MMP-9 increased earlier and lasted for a longer time in the compression and tension area on the side of irradiation by He-Ne laser as compared to those on the control side. There was significant difference between the irradiation side and the control side in terms of the MMP-9 expression gray scale in the tension zones at 5 and 7 days post-operation, and in the pressure zones at 3,5,7 day post-operation. **Conclusion** During the movement of orthodontic teeth, local irradiation with He-Ne laser could increase the expression of MMP-9. It was suggested that the irradiation with low power laser accelerate blood vessel and bone remodeling.

【Key words】 He-Ne laser; Tooth movement; Periodontal tissue; Matrix metalloproteinase

在临床上,正畸牙齿移动牙周组织的血管化作用及骨改建过程对矫治疗效的影响较大,是目前口腔正畸学领域研究的热点之一。由于弱激光具有生物刺激效应,可影响细胞膜的通透性,增强各种酶的活性,可使再生组织中的血液循环显著改善^[1],还可刺激胶原合成,提高成骨细胞活性,加快钙质沉积及骨组织再生

等^[2]。而基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinases-9,MMP-9)作为降解细胞外基质(extracellular matrix,ECM)的一种重要酶类,与血管改建及骨改建过程密切相关。本实验通过免疫组织化学及图像分析法,研究了在兔正畸牙齿移动过程中应用氦-氖(He-Ne)激光进行局部照射,其 MMP-9 在牙周组织中表达与分布的变化,从分子水平探讨 He-Ne 激光照射促进正畸牙移动及牙周组织改建的机制及可行性,为其在正畸临床领域的广泛应用提供实验依据。

作者单位:130041 长春,吉林大学口腔医院正畸科(孙新华、林淑艳);吉林百合口腔医院(曲冬)

材料与方法

一、实验动物及分组

选择健康日本大耳白兔 30 只,雌雄不限,平均兔龄为 3.5 个月,平均体重为 2.0 kg,由中国人民解放军军需大学动物部提供。将其随机分为 6 组,分别为 1 d, 3 d, 5 d, 7 d, 14 d 及 21 d 组,每组各 5 只。各组间动物体重、兔龄等差异均无显著性意义,具有可比性。

二、主要试剂及仪器

本研究主要的试剂及仪器包括:鼠抗 MMP-9 单克隆抗体(产品编号 MAB-0245)、免疫组化超敏 SP 试剂盒(产品编号 KIT-9710)、DAB 发色剂(福州迈新生物技术开发公司)、ZL-1 型正畸测力计(西北工业大学与秦都口腔医院联合研制)、氦-氖激光治疗仪 HNGSQ-I 型(上海产)、OLYMPUS 光学显微镜系统(日本产)、HPIAS-1000 图像分析系统(华中科技大学同济医学院提供)。

三、实验方法

采用 2% 的戊巴比妥钠溶液经兔耳缘静脉按每千克体重 2 ml 注射,当麻醉剂生效后暴露兔口腔,使用牙科高速涡轮车针在实验动物左、右侧上颌切牙及第 1 磨牙的近中颊侧近龈缘处磨出一浅固位沟,用直径 0.25 mm 的不锈钢结扎丝在同侧上颌切牙与上颌第 1 磨牙间拴结不锈钢螺旋弹簧,调整牵引力为 80 g,牵引上颌第 1 磨牙向近中移动;应用 ZL-1 型正畸测力计测力。实验动物右侧为照射侧,左侧为对照侧。将各组动物右侧上颌第 1 磨牙相对应的颊部皮肤备皮,使用 He-Ne 激光局部照射,波长 632.8 nm,输出功率 20 mW,照射距离 50.0 cm,光斑直径 3.0 cm,被照射处的功率密度为 2.83 mW/cm²,能量密度 2.5 J/cm²,每次照射 15 min。1 d 组仅照射 1 次,3 d 组每天照射 1 次,共照射 3 次,其余各组均每天照射 1 次,连续照射 5 次后即不再继续照射。

四、标本制作及染色

各组动物分别经 1, 3, 5, 7, 14 及 21 d 的加力处理后,采取兔耳缘静脉注射麻醉并用 4% 多聚甲醛经颈总动脉灌注后处死。分别取各组实验动物双侧上颌第 1 磨牙及其周围牙槽骨组织(体积约 1.5 cm × 1.8 cm × 0.7 cm),将其固定于 4% 多聚甲醛溶液中。上述待检样本经常规脱钙、脱水、透明及包埋处理后,制成蜡块并进行组织切片。组织切片的方向平行于牙体长轴,作近端、远端及中段连续切片,切片厚约 4 ~ 5 μm。组织切片行常规 SP 法 MMP-9 免疫组织化学染色,石蜡切片脱蜡及水化后,经 EDTA 热抗原修复。阴性对照采用 PBS 代替一抗。

五、显微图像分析

采用病理图文图像分析系统对每张切片进行图像分析。在 20 倍显微镜下观察,分别对各组实验动物照射侧及对照侧第 1 磨牙的近端、远端、中段牙周组织各随机选择 5 个视野,进行 MMP-9 的平均灰度测量。MMP-9 的阳性强度用平均灰度差值表示,每张切片均测量其背景灰度,用以消除切片间的误差。

六、统计学分析

采取自身配对设计,应用 SPSS 11 统计软件对实验结果进行统计学分析。观察实验动物加力后第 1, 3, 5, 7, 14 及 21 天时,对照侧与照射侧间 MMP-9 表达的变化,计算并分析各组图像的灰度数据,得出平均值及标准差,最后将各组实验动物对照侧与照射侧切片的平均灰度值进行两样本间的 *t* 检验分析, *P* < 0.05 为差异具有显著性意义。

结 果

一、兔牙周组织张力区中照射侧与对照侧 MMP-9 含量比较

实验兔牙周组织经 He-Ne 激光照射后,其照射侧张力区兔牙周组织中 MMP-9 含量在施力后呈增加趋势,并于施力后第 7 天时达到峰值,同时还发现照射侧张力区血管扩张,新生血管均沿着成骨活跃部位分布,牙周膜纤维排列规则,血管与骨组织的新生活均较对照侧活跃;张力区成骨细胞胞浆及血管内皮细胞胞浆 MMP-9 均呈强阳性表达(图 1)。对照侧张力区兔牙周组织中 MMP-9 的表达亦有随着时间增加而递增的趋势,并于施力后第 14 天时达到峰值。此时照射侧与对照侧张力区的牙周膜纤维组织均趋于致密,新生血管数目较多,且分布于新生骨表面附近的牙周膜内,并以照射侧显著。加力后第 14 天时,实验动物对照侧新生骨组织呈条索状,照射侧新生骨组织已连接成片(图 2)。照射侧张力区牙周组织于加力后第 5, 7 天时,其 MMP-9 的表达均明显强于对照侧,均 *P* < 0.05,差异有显著性意义。各组实验动物分别经不同时间的 He-Ne 激光照射后,其对照侧与照射侧张力区牙周组织中的 MMP-9 表达灰度值见表 1。

表 1 兔牙周组织张力区中 He-Ne 激光照射侧与对照侧 MMP-9 表达灰度值的比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	对照侧	照射侧
1 d 组	89.43 ± 5.22	86.34 ± 10.85
3 d 组	95.58 ± 16.65	99.68 ± 14.09
5 d 组	116.44 ± 7.34	127.68 ± 10.45 *
7 d 组	143.76 ± 18.45	167.89 ± 23.44 *
14 d 组	163.43 ± 18.49	170.53 ± 8.01
21 d 组	113.99 ± 12.15	117.39 ± 13.47

注:与对照侧比较, * *P* < 0.05

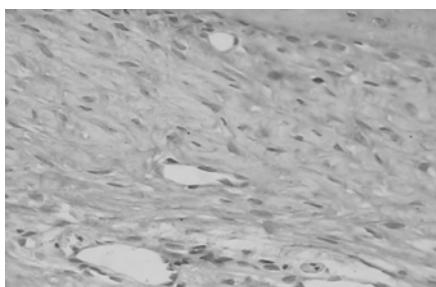


图1 7 d 组照射侧张力区 MMP-9 表达(SP 染色 ×20)

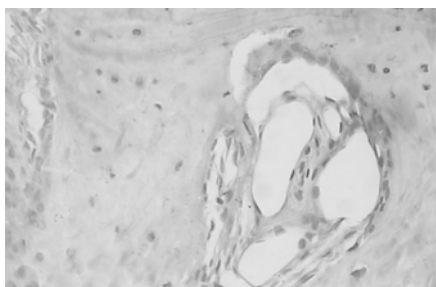


图2 术后 14d 组对照侧张力区 MMP-9 表达(SP 染色 ×20)

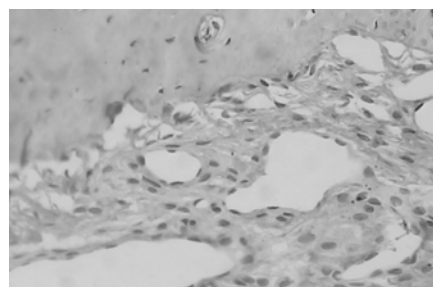


图3 术后 5 d 组对照侧压力区 MMP-9 表达(SP 染色 ×20)

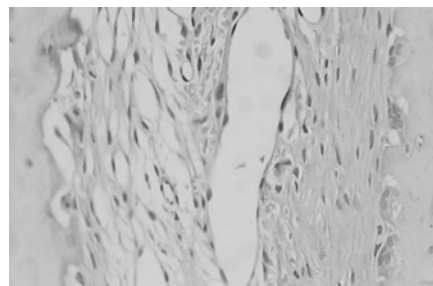


图4 术后 5 d 组照射侧压力区 MMP-9 表达(SP 染色 ×20)

二、兔牙周组织压力区中照射侧与对照侧 MMP-9 含量比较

实验兔牙周组织经激光照射后,其照射侧压力区牙周组织中 MMP-9 的表达于施力后呈显著增强趋势,于施力后第 5 天时达到高峰;施力 5 d 后,照射侧压力区牙周膜周围分布有较多的成纤维细胞,血管腔呈梭形,有较多的新生血管,牙槽骨表面有较多的骨吸收陷窝及破骨细胞,破骨细胞胞浆中的 MMP-9 呈强阳性表达(图 3)。对照侧压力区牙周组织中 MMP-9 的表达在施力后亦呈增加趋势,并于施力后第 5 天时达到峰值,随后下降;牙周膜及牙槽骨内可见有新生血管,牙槽嵴顶部骨表面有多个骨吸收陷窝,陷窝中可见多核破骨细胞,破骨细胞胞浆中 MMP-9 呈强阳性表达,照射侧牙周组织中 MMP-9 的表达在施力后第 1,21 天时低于对照侧,在施力后第 3,5,7 天时均高于对照侧(图 4), $P < 0.05$ 或 0.01 ,差异均有显著性意义,具体数据见表 2。

表 2 兔牙周组织压力区中 He-Ne 激光照射侧与对照侧 MMP-9 表达灰度值的比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	对照侧	照射侧
1 d 组	99.35 ± 15.80	95.52 ± 20.32
3 d 组	95.58 ± 17.00	118.07 ± 13.35 *
5 d 组	159.47 ± 18.49	179.53 ± 14.79 *
7 d 组	156.73 ± 11.17	173.03 ± 7.26 **
14 d 组	140.44 ± 7.34	153.58 ± 10.45
21 d 组	132.20 ± 10.91	127.39 ± 14.44

注:与对照侧比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

讨 论

MMP-9 亦称明胶酶 B,具有广泛的底物特性(包括 I,III,IV,V 型胶原、明胶及弹性蛋白等),主要底物是 IV,V 型胶原和明胶。MMP-9 可由多种细胞分泌,包括多形核中性粒细胞、成纤维细胞、毛细血管内皮细胞、巨噬细胞及一些正常细胞等。有研究表明,毛细血管内皮细胞产生的 MMP-9 在血管生成及再生过程中具有重要意义^[3],因此本研究选择 MMP-9 作为检测指标。我们在实验中发现,兔正畸牙移动牙周组织受局部机械压力与张力的刺激,其局部的血液循环状况会产生相应的反应,如局部组织缺血、缺氧及炎症反应,白细胞可产生 MMP-9,中性粒细胞不仅可分泌 MMP-9,还可分泌 VEGFs,从而参与血管的改建过程。在加力后第 5 天时,对照侧压力区 MMP-9 的表达呈强阳性,表明此时压力区血管内皮细胞 MMP-9 的表达达到高峰,同时亦表明压力区血管基底膜的降解此时达到高峰;而对照侧张力区 MMP-9 在加力后第 14 天时达到高峰,新生毛细血管内皮细胞的 MMP-9 表达呈现强阳性,亦说明此时张力区的新生血管增多。本实验结果符合正畸牙移动牙周组织血管改建过程的规律。

MMP-9 在骨改建过程中的作用机制主要有以下方面:(1)通过其明胶酶作用,协助组织蛋白酶及间质胶原酶参与 I 型胶原(骨基质主要成分)及其片段(I 型明胶)的降解;(2)通过其 IV、V 型胶原的降解作用,协同破骨细胞穿透血管壁过程,并促使破骨细胞在骨组织中局部聚集、活化、贴附;(3)MMP-9 在骨形成过程中也发挥着重要作用;Rice 等^[4]利用原位杂交法观

测到胚胎发育 16 d 后的小鼠颅骨中,其破骨细胞分泌大量的 MMP-9,而且集中于骨形成活跃的区域。本实验观察到加力第 14 天时,兔牙周组织张力区骨形成活跃处的 MMP-9 含量达到高峰,由此说明 MMP-9 不仅与血管改建相关,还与骨改建有着密切联系。

在一系列基础及临床研究中,学者们发现弱激光具有特殊效应,即作用于生物体时无不可逆性损伤,而直接由激光辐射刺激产生生物学效应,如利用弱激光进行病灶直接照射或穴位照射均具有消炎、镇痛、扩张血管、促进骨再生等效应;在微生物研究方面,发现经弱激光照射后,其机体内酶活力提高。有报道认为,He-Ne 激光促进骨折愈合的机制可能与以下因素有关:He-Ne 激光可使新生血管增生、生长加速、血管扩张,并使血管重建的演化过程明显快于自然愈合过程,改善骨折端及周围组织的血液循环及代谢水平^[5],加速胶原生成及钙盐沉积^[6],刺激成纤维细胞及成骨细胞活性,促使碱性磷酸酶活性升高^[7]。须藤敦夫^[8]报道了在猫实验性牙齿移动过程中,用弱激光照射其牙周组织,可促进成骨细胞、破骨细胞的分化及活性;孙新华等^[9]在兔正畸牙移动实验中,研究弱激光照射对兔牙周血管及骨组织改建进程的影响,发现弱激光照射侧牙周组织比对照侧表现出更明显的促血管化作用,破骨活动与成骨活动亦均较对照侧活跃。

本研究应用 He-Ne 激光照射来观察正畸牙齿移动过程中 MMP-9 表达的变化。从实验结果中可以看出,无论是压力区,还是张力区,He-Ne 激光照射侧出现 MMP-9 表达增强的现象均较对照侧早,峰值亦较对照侧高。He-Ne 激光照射侧牙周组织压力区 MMP-9 的表达在术后第 3,5,7 天时均显著高于对照侧($P < 0.05$),说明 He-Ne 激光照射促进了牙周组织压力区的血流速度和血管新生过程,可为其破骨活动提供营养物质并运走废料,促进牙周组织代谢;He-Ne 激光照射还可促进前破骨细胞向破骨细胞的最终分化,加速其破骨活动。He-Ne 激光照射侧牙周组织张力区 MMP-9 的表达于术后第 5,7,14 及 21 天时均显著高于对照侧,表明兔牙周组织经 He-Ne 激光照射后,促

进了成骨细胞和血管内皮细胞分泌 MMP-9。由于 MMP-9 具有促进血管新生的作用,加之弱激光的生物刺激效应可扩张血管,促进牙周组织的血液循环,丰富的血流供应可促使细胞分化、增殖加速,加快胶原的合成,大量新生的血管还为骨改建过程提供了保障作用,促进了兔牙周组织张力区的成骨反应。

综上所述,本实验表明兔正畸牙组织经 He-Ne 激光照射后,能促进牙周组织细胞产生及分泌 MMP-9,增强牙周组织中 MMP-9 酶的活性,促进牙周组织细胞的分化、增殖及血管新生过程;在促进骨吸收的同时,也促进了骨的生成,从而加速了正畸牙齿移动过程中的血管改建及骨改建过程。本实验为弱激光照射促进正畸牙齿牙周组织中的血管改建及骨改建过程提供了进一步的理论依据,但对有关弱激光及 MMP-9 在血管与骨改建方面的作用机制,仍有待更深入的探讨。

参 考 文 献

- 1 Trueta JA. The roles of vessels in osteogenesis. J Bone Joint Surg, 1963, 45:402-407.
- 2 Freitas FM, Bskas V, Cruz H. Laser effects on osteogenesis. Appl Laser Sci, 2000, 154:548-554.
- 3 Jackson CJ, Ngyen M. Human microvascular endothelial cells differ from macrovascular endothelial cells in their expression of matrix metalloproteinase. Int J Biochem Cell Biol, 1997, 29:1167-1177.
- 4 Rice DP, Kim HJ, Theleff I. Detection of gelatinase B expression reveals osteoclastic bone resorption as a feature of early calvarial bone development. Bone, 1997, 21:479-486.
- 5 王康, 耿建华, 陈英茂. 氦氖激光对兔胫骨愈合微血管重建的影响. 中华理疗杂志, 1998, 21:11-13.
- 6 张建国, 周摇江, 李华滢. He-Ne 激光和弱激光促进骨折愈合的实验研究. 承德医学院学报, 1998, 15:1-3.
- 7 Kana JS, Hutschenreiter G, Haina D, et al. Effect of low-power density laser radiation on healing of open skin wounds in rats. Arch Surg, 1981, 116:293-296.
- 8 须藤敦夫. 人為的齒の移動にすける低出力レーザー照射の影響. 奥羽大学歯学雑誌, 1995, 22:252-266.
- 9 孙新华, 朱宪春, 徐成伟, 等. 弱激光照射对兔牙移动速度及骨改建影响的实验研究. 华西口腔医学杂志, 2001, 19:290-293.

(收稿日期:2003-07-24)

(本文编辑:易 浩)

· 消息 ·

疗养学组在厦门召开学术会议的征文通知

中华医学会物理医学与康复学分会疗养学组、中国职工疗养协会物理专业委员会和福建省医学会物理医学与康复学分会拟于 2004 年 6 月在福建省厦门市联合召开物理医学与康复学学术交流会议。征文内容:①21 世纪的物理医学与康复学及疗养学;②物理医学与康复学的基础理论与临床应用;③新形势下疗养院如何开展工作;④物理因子在疗养学中的应用;⑤疗养院中的康复医学。征文要求:未公开发表的论文(带摘要),具有科学性与真实性、语言精练,请尽量提供打印稿(不需附图以便汇编),于稿件上注明作者姓名、工作单位和通信地址,自留底稿。截稿日期:2004 年 5 月 10 日。通信地址:(100730)北京市东单大华路 1 号 北京医院康复医学科;联系人:李艳;联系电话:(010)65132266-2516 或 2517;E-mail:Lijing502@263.net。

中华医学会物理医学与康复学分会