

基础研究

DOI: 10.11699/cyxb20130721

穴位电针对功能矫治大鼠咀嚼肌基质金属蛋白酶-9 表达的影响

尹灵芝¹, 王 强², 王豫蓉¹, 文 华¹

(1. 重庆医科大学附属口腔医院正畸科、重庆市口腔疾病与生物医学研究中心, 重庆 400015;

2. 德阳市口腔医院正畸科, 德阳 618000)

【摘要】目的:研究穴位电针对大鼠下颌前伸后咀嚼肌中基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)表达的影响。**方法:**60 只雄性 SD 大鼠随机分为 12 组($n=5$):空白对照 3、7、14、21 d 组, 条件对照 3、7、14、21 d 组和实验 3、7、14、21 d 组。采用免疫组化染色法和荧光定量 PCR 法检测大鼠二腹肌前腹中 MMP-9 表达的差异。**结果:**与空白对照组比较, 条件对照组在 7、14 d 时 MMP-9 表达明显上升($P<0.05$), 实验组在 3、7、14 d 时 MMP-9 的表达明显上升($P<0.05$);与条件对照组比较, 实验组在 3、7 d 时 MMP-9 的表达明显上升($P<0.05$), 14 d 时两组无明显差异($P>0.05$), 实验组 21 d MMP-9 表达量降低($P<0.05$)。**结论:**穴位电针可早期上调大鼠下颌前伸咀嚼肌中 MMP-9 的表达, 促进大鼠咀嚼肌的适应性改建。

【关键词】穴位电针; 下颌前伸; 咀嚼肌; 基质金属蛋白酶-9

【中国图书分类法分类号】R781.5

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-12-20

Effects of acupoints electroacupuncture on the expression of matrix metalloproteinase-9 in the mandibular protrusion of rats

YIN Lingzhi¹, WANG Qiang², WANG Yurong¹, WEN Hua¹

(1. Department of Orthodontics, Chongqing Center for Oral Diseases and Biomedical Research, Hospital of Stomatology, Chongqing Medical University; 2. Department of Orthodontics, Stomatology Hospital of Deyang)

【Abstract】Objective: To investigate effects of acupoints electroacupuncture on the expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in the mandibular protrusion of rats. **Methods:** Totally 60 male SD rats were randomly divided into 4 blank control groups, 4 conditional control groups and 4 experimental groups ($n=5$, respectively). Rats were sacrificed on 3, 7, 14, 28 d after experimental mandibular protrusion. Immunohistochemistry and real-time PCR methods were used to detect expressions of MMP-9 in growing rats' masticatory muscle. **Results:** Compared with those in blank control groups, MMP-9 expressions were significantly increased in conditional control group on 7, 14 d, with statistical differences ($P<0.05$); MMP-9 expressions were significantly increased in experimental group on 3, 7, 14 d, with statistical differences ($P<0.05$). Compared with those in conditional control group, MMP-9 expressions were significantly increased in experimental group on 3, 7 d, with statistical differences ($P<0.05$); there was no significant difference between the two groups on 14 d ($P>0.05$); MMP-9 expressions were significantly decreased in experimental group on 21 d, with statistical differences ($P<0.05$). **Conclusions:** Electric acupuncture can up regulate the expression of MMP-9 in rats masticatory muscle after functional mandibular protrusion, which may improve the treatment effect of functional appliance.

【Key words】acupoints electroacupuncture; mandibular protrusion; masticatory muscle; matrix metalloproteinase-9

在临床正畸中, 利用功能矫治器、牵张成骨术治疗骨性错牙合畸形过程中, 周围软组织受到牵拉并产生一系列的适应性改变来稳定治疗效果^[1-2]。由于功能矫治结束后肌肉仍处于不断改建的过程中, 这是造成功能矫治远期效果不稳定的主要因素^[3]。目前的研究, 是把肌肉稳定在理想的咬合位置足够

长的时间, 以使肌肉在新的咬合位置达到稳定的状态, 从而提高功能矫治的成功率。穴位电针是在传统针灸的基础上, 在针尾处通电, 通过电针刺激穴位而达到治疗目的, 主要用于肌肉骨骼和神经系统疾病的治疗, 其显著的疗效受到越来越多的关注^[4]。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)家族中, MMP-9 在骨骼肌改建中起着特别重要的作用^[5-7]。本实验建立下颌前伸的动物模型同时给予电针刺激, 旨在了解穴位电针对下颌前伸大鼠肌肉改建的影响, 探讨穴位电针应用于功能矫治的可能性。

作者介绍: 尹灵芝, Email: xyklzty@yahoo.cn,

研究方向: 口腔正畸学。

通信作者: 王豫蓉, Email: yrwmn66@yahoo.com.cn。

基金项目: 重庆市卫生局中医药科研计划资助项目(编号: 2010-2-93)。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物与分组 选取 5 周龄健康雄性 SD 大鼠 60 只, 体质量 (100 ± 5) g, 均购自重庆医科大学实验动物中心, 动物合格证号: SCXK(X)2010-0001。所有动物实验前自由饮水, 定时摄食。按随机分组原则均分为 12 组 ($n=5$), 分别为 4 个不同时间空白对照组 (不戴矫治器, 不进行穴位电针刺激 3、7、14、21 d 组), 4 个不同时间条件对照组 (戴用矫治器, 不进行穴位电针刺激 3、7、14、21 d 组), 4 个不同时间实验组 (穴位电针刺激后戴用矫治器, 3、7、14、21 d 组)。

1.1.2 仪器和试剂 矫治器参照罗颂椒等^[8]使用的颌下前伸装置, 其由塑料底板、斜面导板和口外固位臂 3 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 $20^\circ \sim 25^\circ$; HM6805-1 型电针仪 (四川恒明科技发展有限公司); Z233MK-2 低温离心机 (HERMLE, 德国); C-1000 荧光定量 PCR 仪 (BIO-Rad, 美国)。兔抗鼠 MMP-9 (Epitomics, 美国), SABC 试剂盒及 DAB 显色试剂盒 (武汉博士德公司, 批号为 SA2002); 离心柱型 RNA 快速抽提试剂盒, Super RT Kit cDNA 第 1 链合成试剂盒, 2 × SYBR real-time PCR premixture (均购自北京百泰克生物技术公司, 批号分别为 PR6612, PR7011)。

1.2 实验方法

1.2.1 实验动物造模 将功能矫治器戴于条件对照组和实验组大鼠上颌切牙上, 再用橡皮圈固位于大鼠鼻上颌复合体并以特制的颈圈用来防止鼠前爪干扰矫治器^[9]。实验组大鼠选双侧颊车穴、翳风穴进行电针刺激。穴位定位根据中国针灸学会学术部提供的《大鼠穴位图谱》、中国针灸学会实验针灸分会制定的《动物针灸穴位图谱》以及比较解剖穴原理, 参照人体经穴定穴。“翳风穴”定位于乳突尖至下颌升支后缘垂线的中点, 直刺 2 mm; “颊车穴”定位于下颌角前上方咬肌最丰隆处中点, 直刺 2 mm。连接电针仪^[10]。参数为: 疏密波, 频率 20 Hz, 强度为面部肌肉轻微颤动为度, 持续时间为 15 min。每日 1 次, 分别刺激 3、7、14、21 d。

1.2.2 标本制备 实验大鼠分别在戴用矫治器 3、7、14、21 d 后断颈处死。各组均取大鼠左侧二腹肌前腹置于无酶 EP 管中, 迅速转移至液氮罐, 储存于 -80°C 冰箱。右侧二腹肌前腹置于现配的 4% 多聚甲醛固定 12 h, 脱水, 透明, 石蜡包埋。每

块组织作连续切片 5 张。1 张 HE 染色, 其他 4 张用于免疫组化。

1.2.3 SABC 法免疫组化 取上述标本, 常规脱蜡, 枸橼酸缓冲液浸泡, 微波修复暴露抗原, H_2O_2 孵育阻断内源性过氧化氢酶的活性, 滴加山羊血清封闭液封闭、一抗 4°C 过夜孵育、二抗 37°C 孵育、滴加 SABC, 37°C 孵育, DAB 显色液显色。苏木精复染, 脱水封片。

1.2.4 Real-time PCR 采用 RNA 快速提取试剂盒提取二腹肌总 RNA, 所提的 RNA 用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性, 紫外分光光度计检测 RNA 的浓度, 逆转录合成 cDNA, 分别按说明书进行。引物合成设计为 MMP-9 上游引物: $5' \text{---} \text{CCCTACTGCTGGTCCTTCTGAG} \text{---} 3'$; 下游引物: $5' \text{---} \text{TGGCTTCCTCCGTGATTCG} \text{---} 3'$, 产物长度为 159 bp。β-actin 上游引物: $5' \text{---} \text{TCTACAATGATGAGCTGCGTGTGG} \text{---} 3'$; 下游引物: $5' \text{---} \text{ATACCCAGGAAGGAAGGCTGGAAG} \text{---} 3'$, 产物长度为 300 bp。荧光 PCR 反应体系按说明书进行, 反应条件为: 95°C 2 min, 95°C 10 s, 57°C 20 s, 72°C 30 s, 共计 40 个循环。

1.3 数据分析与处理

本次研究使用 SPSS 18.0 统计软件包进行分析, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 各组间比较采用 Dunnett-*t* 法, 检验水准 $\alpha=0.05$ (双侧)。

2 结果

2.1 SABC 法染色结果

图 1 为空白对照组、条件对照组与实验组在 7 d 的 MMP-9 蛋白的免疫组化染色结果。图中显示二腹肌肌纤维呈棕黄色阳性反应。对其灰度值 [积分光密度 (integral optical density, IOD) 值] 进行分析, 空白对照组、条件对照组与实验组染色存在统计学差异, 统计结果见表 1。结果显示, 与空白对照组比较, 条件对照组 7、14 d, MMP-9 蛋白表达上升 ($t_{\text{D 条件对照组 7 d}}=2.93, P=0.019$; $t_{\text{D 条件对照组 14 d}}=2.63, P=0.030$); 实验组 3、7、14 d, MMP-9 蛋白表达明显上升 ($t_{\text{D 实验组 3 d}}=4.52, P=0.002$; $t_{\text{D 实验组 7 d}}=6.33, P=0.000$; $t_{\text{D 实验组 14 d}}=2.41, P=0.040$); 与条件对照组相比较, 实验组 3、7 d, MMP-9 蛋白表达上升 ($t_{\text{D 实验组 3 d}}=2.93, P=0.019$; $t_{\text{D 实验组 7 d}}=3.33, P=0.010$); 14 d 时两组无明显差异 ($t_{\text{D 实验组 14 d}}=-0.39, P=0.706$); 实验组 21 d MMP-9 蛋白表达降低 ($t_{\text{D 实验组 21 d}}=-2.36, P=0.046$)。

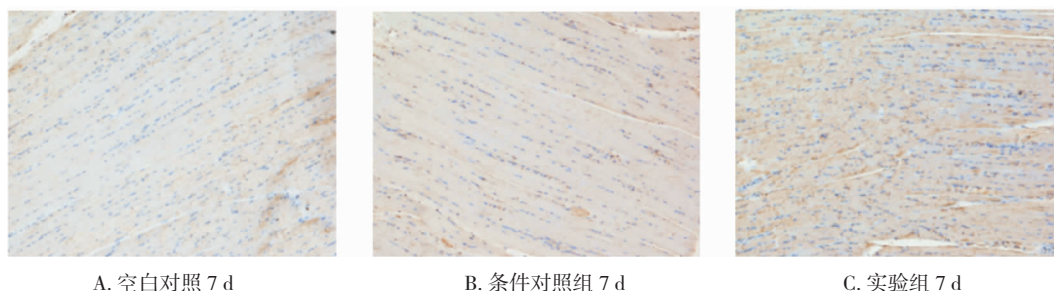


图 1 MMP-9 蛋白 SABC 法染色结果 (100 ×)

Fig.1 Results of SABC staining of MMP-9 protein (100 ×)

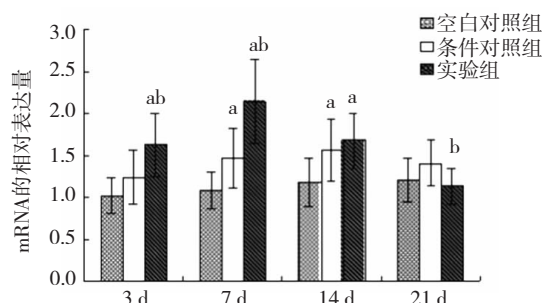
表 1 MMP-9 图像分析 IOD 值变化 ($\bar{x} \pm s$)
Tab.1 MMP-9 image analysis IOD value changes ($\bar{x} \pm s$)

组别	3 d	7 d	14 d	21 d
空白对照组	113.12 ± 18.18	112.62 ± 17.58	110.75 ± 20.69	124.49 ± 16.15
条件对照组	135.30 ± 15.00	147.47 ± 19.91 ^a	148.89 ± 24.94 ^a	143.98 ± 15.06
实验组	168.73 ± 20.69 ^{ab}	190.88 ± 21.33 ^{ab}	143.11 ± 21.78 ^a	121.81 ± 14.69 ^b

注:与正常对照组比较,a, $P < 0.05$;与条件对照组比较,b, $P < 0.05$

2.2 MMP-9 mRNA 表达差异

Real-time PCR 结果:组织中提出总 RNA, $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 比值均为 1.8~2.0 之间,说明所提 RNA 纯度较好。Real-time PCR 检测 MMP-9 基因 mRNA 结果见图 2。以空白对照组 3 d MMP-9 mRNA 的表达为参照标准,用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算 MMP-9 mRNA 的相对表达量如图 2 所示;同条件对照组比较,实验组在 3、7 d 时 MMP-9 mRNA 表达有明显升高($t_{D\text{ 实验组}3d}=2.22, P=0.044; t_{D\text{ 实验组}7d}=3.13, P=0.360$);14 d 两组无明显差异($t_{\text{实验组}14d}=0.676, P=0.510$);实验组 21 d MMP-9 mRNA 表达降低($t_{D\text{ 实验组}21d}=-2.20, P=0.046$)。荧光定量 PCR 的结果与免疫组化结果一致。



a. 与正常对照组比较, $P < 0.05$; b. 与条件对照组比较, $P < 0.05$

图 2 MMP-9 基因 mRNA 的相对表达量

Fig.2 MMP-9 gene mRNA relative expression level

3 讨论

临床上对于安氏 II 类处于青春生长发育期的患者,常使用功能矫治器前伸患者下颌,刺激下颌生长,改善患者面型^[11]。功能矫治器是利用肌功能对颌骨生长产生引导,借助于被牵张肌肉及相应软组织收缩的力量,引导并刺激牙、牙槽骨和颌骨的协调生长,从而矫正颌骨异常的生长和位置;同时相关咀嚼肌发生适应性改建,稳定和保持下颌生长的结果^[12-13]。但由于功能矫治结束后神经肌肉仍处于不断改建的过程中,这是造成功能矫治远期效果不稳定的主要因素^[3],Vardimon 等^[14]提出延长矫治器戴用时间,可能在一定程度上弥补戴用传统功能矫治器后肌肉适应差的特点,但延长矫治器的戴用时

间增加了患者的不适从而降低了患者的依从性^[15],因此寻找一种高效稳定的治疗方法成为一个重要的研究方向。针灸治疗对于肌肉骨骼系统疾病的有效性在许多临床和基础研究中已得到证实, Kim 等^[16]研究发现针灸能够促进患有有关节炎的小鼠肌肉的改建和再生;张稀和魏清琳^[17]研究发现针灸对周围性面瘫患者面肌功能的恢复具有促进作用。本研究选用处于青春生长高峰期的 5 周龄大鼠,分别在戴用功能矫治器 3、7、14、21 d 后处死,观察穴位电针能否促进功能矫治过程中肌肉改建以及其在功能矫治不同时期的影响。

MMPs 是一种锌依赖性内肽酶家族,在大多数组织中均存在。骨骼肌中,MMPs 在肌肉的生理状态(发育、血管形成、适应性改建)以及病理状态的改建过程均起着重要作用^[18]。在 MMPs 家族中,MMP-9 参与成肌细胞的迁移,肌小管的形成,以及骨骼肌基底膜降解。Kherif 等^[19]和 Zimowska 等^[20]研究发现在慢肌肌溶解和重建、肌肉再生以及外伤后改建中,MMP-9 的表达均上升,MMP-9 的表达升高可作为肌肉改建活跃的指标。本实验研究显示:与空白对照组比较,7、14 d 时条件对照组二腹肌前腹中 MMP-9 mRNA 和蛋白表达上升,提示骨骼肌活跃改建期出现在戴用功能矫治器稍长一段时间后。实验组大鼠同条件对照组相比,MMP-9 mRNA 和蛋白的表达在 3、7 d 明显上升,说明与单独下颌前伸比较,电针刺激组在戴用功能矫治器的早期即可进入活跃的改建期。14 d 时 2 组在 MMP-9 蛋白和 mRNA 的表达水平上无明显差异。21 d 时 MMP-9 蛋白及 mRNA 表达水平降低,说明此时单纯下颌前伸大鼠骨骼肌仍处于改建期;而穴位电针刺激组改建基本完成;同时提示穴位电针刺激可促使肌肉快速进入改建期并缩短肌肉改建时间。

本研究表明,穴位电针作用于肌肉可早期上调 MMP-9 的表达,促进肌肉改建,有望作为功能矫治的辅助疗法,其原理及具体作用机制以及电针刺激

的最佳时间、频率等还有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Apaydin A, Yazdirduyev B, Can T, et al. Soft tissue changes during distraction osteogenesis[J]. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2011, 40(4): 408–412.
- [2] Tüz H H, Dolanmaz D, Pampu A A, et al. Histomorphometric evaluation of delayed changes in masseter muscle after lengthening the rabbit mandible by distraction osteogenesis [J]. *Oral Dis*, 2009, 15(2): 142–147.
- [3] Sood S, Kharbanda O P, Duggal R, et al. Neuromuscular adaptations with flexible fixed functional appliance—a 2-year follow-up study[J]. *J Orofac Orthop*, 2011, 72(6): 434–445.
- [4] 何 巍, 童元元, 荣培晶, 等. 国外针灸临床试验研究的病种趋势分析[J]. *针刺研究*, 2012, 37(1): 83–86.
- He W, Tong Y Y, Rong P J, et al. Development of clinical trials for acupuncture treatment of common illnesses or clinical conditions in countries outside China[J]. *Acupuncture Research*, 2012, 37(1): 83–86.
- [5] Dias F J, Issa J P, Vicentini F T, et al. Effects of low-level laser therapy on the oxidative metabolism and matrix proteins in the rat masseter muscle[J]. *Photomed Laser Surg*, 2011, 29(10): 677–684.
- [6] Tippet H L, Dodgson L K, Hunt N P, et al. Indices of extracellular matrix turnover in human masseter muscles as markers of craniofacial form—a preliminary study[J]. *Eur J Orthod*, 2008, 30(2): 217–225.
- [7] Sternlicht M D, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2001, 17: 463–516.
- [8] 罗颂椒, 饶 跃, 王大章, 等. 功能矫形前伸下颌对幼年大鼠颌面颌生长发育影响的研究[J]. *华西口腔医学杂志*, 1992, 10(3): 205–209.
- Luo S J, Rao Y, Wang D Z, et al. Craniofacial adaptation after mandibular functional protrusion in young rat[J]. *West China Journal of Stomatol-ogy*, 1992, 10(3): 205–209.
- [9] Shen G, Zhao Z, Kaluarachchi K, et al. Expression of type X collagen and capillary endothelium in condylar cartilage during osteogenic transition—a comparison between adaptive remodeling and natural growth [J]. *Eur J Orthod*, 2006, 28(3): 210–216.
- [10] 姜雪梅, 高彦平, 黄 泳. 翳风穴的形态学特征和临床意义[J]. *中国针灸*, 2005, 25(11): 781–783.
- Jiang X M, Gao Y P, Huang Y. Morphological characteristics and clinical significance of Yifeng (TE 17)[J]. *Chinese Acupuncture & Moxibustion*, 2005, 25(11): 781–783.
- [11] Pepicelli A, Woods M, Briggs C, et al. The mandibular muscles and their importance in orthodontics: a contemporary review[J]. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 2005, 128(6): 774–780.
- [12] Antonarakis G S, Kjellberg H, Kiliaridis S. Predictive value of molar bite force on class II functional appliance treatment outcomes[J]. *Eur J Orthod*, 2012, 34(2): 244–249.
- [13] Gedrange T, Walter B, Tetzlaff I, et al. Regional alterations in fiber type distribution, capillary density, and blood flow after lower jaw sagittal advancement in pig masticatory muscles[J]. *J Dent Res*, 2003, 82(7): 570–574.
- [14] Vardimon A D, Stutzmann J J, Graber T M, et al. Functional orthopedic magnetic appliance (FOMA) II—modus operandi[J]. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 1989, 95(5): 371–387.
- [15] 谢 旭, 谭云锦, 胡春红. FR-3 功能矫治器矫治失败的原因分析[J]. *广东医学*, 2008, 29(2): 278–279.
- Xie X, Tan Y J, Hu C H. Analysis on cause of failure in FR-3 functional appliance treatment[J]. *Guangdong Medical Journal*, 2008, 29(2): 278–279.
- [16] Kim M J, Namgung U, Hong K E. Regenerative effects of moxibustion on skeletal muscle in collagen-induced arthritic mice[J]. *J Acupunct Meridian Stud*, 2012, 5(3): 126–135.
- [17] 张 稀, 魏清琳. 改良烧山火法治疗周围性面瘫[J]. *中国针灸*, 2011, 31(9): 803–805.
- Zhang X, Wei Q L. Peripheral facial paralysis treated with the adapted acupuncture technique of heat-producing needling[J]. *Chinese Acupuncture & Moxibustion*, 2011, 31(9): 803–805.
- [18] Yeghiazaryan M, Zybura-Broda K, Cabaj A, et al. Fine-structural distribution of MMP-2 and MMP-9 activities in the rat skeletal muscle upon training: a study by high-resolution in situ zymography[J]. *Histochem Cell Biol*, 2012, 138(1): 75–87.
- [19] Kherif S, Dehaupas M, Lafuma C, et al. Matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 in denervated muscle and injured nerve[J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 1998, 24(4): 309–319.
- [20] Zimowska M, Brzoska E, Swierczynska M, et al. Distinct patterns of MMP-9 and MMP-2 activity in slow and fast twitch skeletal muscle regeneration in vivo[J]. *Int J Dev Biol*, 2008, 52(2–3): 307–314.

(责任编辑: 唐秋姗)