

网络出版时间:2023-07-13 16:25:16 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms2/detail/34.1065.R.20230713.1442.054.html

◇口腔医学研究◇

TIMP-1 在大鼠不可复性牙髓炎中的抗炎作用

唐颖,李午丽,杨琪,王璐,李颂

摘要 **目的** 研究金属蛋白酶抑制剂 1 (TIMP-1) 在大鼠不可复性牙髓炎模型活髓保存治疗中的抗炎作用。**方法** 对 8~10 周龄雄性大鼠上颌第一磨牙采用髓腔开放法建立不可复性牙髓炎模型,髓腔开放 24、36、48 h 后进行牙髓切断术,用 TIMP-1 覆盖牙髓断面 (TIMP-1 组),生理盐水作为对照 (NS 组),玻璃离子填充窝洞。给药后 24、48 h 分别进行组织学及免疫组化分析。**结果** HE 染色切片的组织病理学定量分析结果显示,TIMP-1 组的根髓炎性细胞反应、根髓组织形态改变、根髓坏死范围的炎症评分高于 NS 组 ($P < 0.001$ 或 $P < 0.01$)。免疫荧光染色 (CD68 标记) 切片显示,TIMP-1 组 CD68 免疫荧光强度高于 NS 组 ($P < 0.001$)。**结论** TIMP-1 在大鼠不可复性牙髓炎模型中无抗炎作用,且加重了根髓的炎症程度。

关键词 不可复性牙髓炎;活髓保存治疗;金属蛋白酶组织抑制剂 1;髓腔开放法

中图分类号 R 781.31

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)08-1408-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.08.027

活髓保存治疗 (vital pulp therapy, VPT) 是在深龋露髓诊断为不可复性牙髓炎的成熟恒牙中的应用,目前已有大量的临床研究,但缺乏组织学研究来观察治疗后牙髓炎症状态的转变。在炎症发展过程中,炎症递质介导了组织的损伤、炎性渗出等反应,其中基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 在牙髓炎中起着至关重要的作用^[1]。MMP-9 可以降解破坏细胞外基质,金属蛋白酶抑制剂 1 (tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP-1) 是 MMP-9 的天然抑制剂,可以通过与 MMP-9 形成抑制性复合物来防止细胞外基质分解^[2]。研究显示牙髓炎症期间牙髓中的 MMP-9 含量随着炎症进展升高,同时 TIMP-1 的含量会随着牙髓炎症的进展而降低,说明

TIMP-1 与牙髓炎的发展存在一定的相关性^[3],并且 TIMP-1 可以诱导大鼠健康牙髓形成修复性牙本质^[4],但是健康牙髓模型不能反映炎症牙髓的组织病理学状态。该研究建立实验性大鼠不可复性牙髓炎模型,在活髓切断术中应用 TIMP-1,旨在探讨 TIMP-1 在牙髓炎中的抗炎作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 72 只 8~10 周龄成年雄性 SD 大鼠,SPF 级,300 g $\pm$ 50 g,口腔卫生状况良好,无龋病及牙周疾病。研究通过安徽医科大学实验动物伦理委员会的伦理审查 (编号:LLSC20221248)。

1.2 主要材料与仪器 光学显微镜 (型号:Nikon Eclipse E100) 购于日本尼康公司;移动式牙科治疗机 (型号:PC2930) 购于广州市广州超盛医疗器械有限公司;高速涡轮手机 (型号:T3 Racer Midwest) 购于德国西诺德公司;根管口探针 (型号:DG-16) 购于美国登士柏公司;高速钨钢车针球钻 (型号:BR-49) 购于日本 MANI 公司;碘伏消毒液 (货号:3180132) 购于深圳市安多福消毒高科技股份有限公司;生理盐水 (货号:R00641) 购于成都市四川科伦药业股份有限公司;TIMP-1 (货号:410-01) 购于美国 Pepro-Tech 公司;玻璃离子水门汀 (货号:56633) 购于美国 3M 公司;一抗 CD68 (货号:GB113109) 购于武汉塞维尔生物科技有限公司;二抗 CY3 山羊抗 rab (货号:GB21303) 购于武汉谷歌生物科技有限公司。

1.3 不可复性牙髓炎模型的建立 大鼠腹腔注射 1% 戊巴比妥钠 (3 ml/kg),取仰卧位固定于操作台上,0.5% 碘伏消毒口腔及口周后,使用高速涡轮手机及 BR-49 球钻在水冷却下于大鼠双侧上颌第一磨牙咬牙面中央窝钻磨,注意要间断磨除防止产热过多或意外穿髓,直至窝洞底牙本质透红,DG16 探针略微加压穿透髓室顶,见出血点,即为穿髓成功。每个磨牙窝洞的制备均使用全新及同一批次的 BR-49 球钻以及 DG16 探针。根据开髓后髓腔开放不同时间分为 6、12、24、36、48、72 h 组,每组 4 只共 24 只大鼠。取上颌骨,分为左右两半,4% 多聚甲醛

2023-05-24 接收

基金项目:安徽省高校自然科学研究项目 (编号:KJ2020A0164)

作者单位:安徽医科大学口腔医学院,安徽医科大学附属口腔医院,
安徽省口腔疾病研究重点实验室,合肥 230032

作者简介:唐颖,女,硕士研究生;

李颂,女,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:3197053337@qq.com

外固定 48 h,组织切片 HE 染色。分析观察牙髓炎模型的 HE 切片,选取出具有典型不可复性牙髓炎组织病理学特点且炎症局限于冠部的髓腔开放时长——髓腔开放 24、36、48 h,后续的实验在此基础上进行。

1.4 不可复性牙髓炎的炎症牙髓切除 髓腔开放 24、36、48 h 诱导不可复性牙髓炎后,大鼠全身麻醉后取仰卧位固定于操作台上,0.5% 碘伏消毒口腔及口周后,BR-49 球钻在水冷却下,在头戴式放大镜的帮助下于大鼠双侧上颌第一磨牙咬牙合面扩大穿髓孔,磨除冠髓,每个磨牙切髓时均使用全新及同一批次的 BR-49 球钻以预防切髓过程中产热不均匀对牙髓炎症产生影响。术中密切观察,及时吸净口腔内的水以防止引起窒息死亡,术后观察大鼠麻醉后苏醒、日常活动以及饮水进食情况。无菌棉球止血,在没有压力的情况下,含有 20 μ l TIMP-1 (200 ng/ml) (TIMP-1 组) 或 20 μ l 生理盐水 (NS 组) 的无菌棉球直接覆盖髓腔 5 min。玻璃离子粘固剂修复空洞。于切髓给药后 24 或 48 h 处死大鼠,每组 4 只大鼠。取上颌骨,分为左右两半,4% 多聚甲醛外固定 48 h,组织切片 HE 及免疫荧光染色。

1.5 组织病理学分析 将组织置于在 EDTA 脱钙液中进行 25 $^{\circ}$ C 恒温脱钙 4 周左右,脱水包埋。将修整好的蜡块置于石蜡切片机,沿磨牙近远中方向平行于牙体长轴制作连续切片,厚 4 μ m。切片 HE 染色,光学显微镜观察。牙髓炎症的病理学评价及评分参照表 1^[5-6],评估包括根髓炎性细胞反应、根髓组织形态改变、根髓坏死范围。

表 1 根髓组织病理学分析评分表

参数	评分
评分一:根髓炎性细胞反应	1 分:靠近牙髓创面部位的组织中无或见散在炎症细胞浸润 2 分:部分根髓中见炎症细胞浸润 3 分:全部根髓中见炎症细胞浸润甚至出现脓肿和坏死 4 分:炎症细胞浸润到达根尖组织
评分二:根髓组织形态改变	1 分:仅出现血管扩张充血 2 分:成牙本质细胞层紊乱 3 分:牙髓组织形态紊乱 4 分:牙髓坏死
评分三:根髓坏死范围	1 分:无 2 分:仅限于上三分之一 3 分:达中三分之一 4 分:完全坏死

1.6 免疫荧光染色 将切片与初级抗体孵育,在切片上滴加使用 PBS 以 1 : 100 稀释配好的一抗

CD68,二抗 CY3 山羊抗 rab 以 1 : 300 稀释。使用了 DAPI 染液进行细胞核染色。

1.7 统计学处理 应用 IBM SPSS 23.0 统计分析软件对 HE 染色切片各实验组牙髓组织炎症评分进行分析;免疫荧光染色切片经 CaseViewer 2.4.0 软件扫描,Image J 软件分析荧光强度,应用 IBM SPSS 23.0 统计分析软件对各实验组免疫荧光强度进行分析。统计数据采用多因素方差分析,按 $\alpha = 0.05$ 水准, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不可复性牙髓炎模型的建立 光学显微镜下观察大鼠牙髓组织切片。髓腔开放 6 h:穿髓孔附近可见轻微炎症细胞浸润及成牙本质细胞层轻微紊乱 (图 1A);髓腔开放 12 h:穿髓孔附近牙髓组织全层紊乱裂解 (图 1B);髓腔开放 24 h:可见冠髓中有微脓肿形成,周围见炎症浸润带,冠髓组织约 1/2 紊乱裂解 (图 1C);髓腔开放 36 h:冠髓可见局部微脓肿,清晰的炎症分界线,冠髓组织约 2/3 紊乱裂解 (图 1D);髓腔开放 48 h:可见微脓肿,大部分冠髓组织紊乱裂解,周围出现炎症界限 (图 1E);髓腔开放 72 h:大范围的冠髓组织液化坏死,局部形成较大脓肿,周围可见清晰的炎症分界线 (图 1F)。髓腔开放 24、36、48 h 时牙髓组织表现出典型的不可复性牙髓炎的表现,且炎症局限于冠髓,选择这三个开放时长进行后续实验。

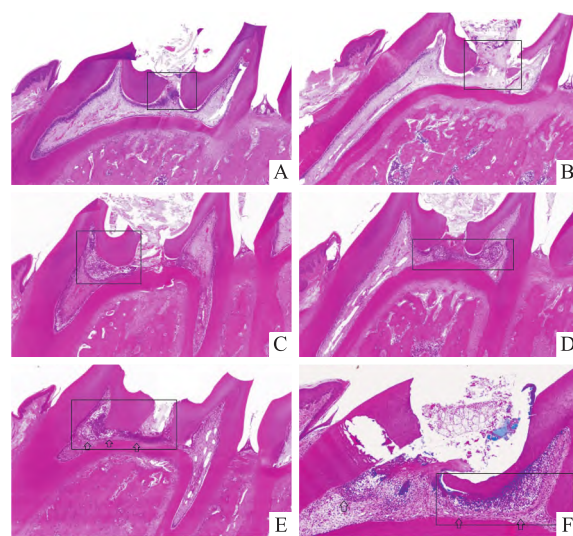


图 1 部分不可复性牙髓炎模型的组织学表现 HE $\times 50$

A:髓腔开放 6 h;B:髓腔开放 12 h;C:髓腔开放 24 h;D:髓腔开放 36 h;E:髓腔开放 48 h;F:髓腔开放 72 h;箭头:指示炎症分界线

2.2 根髓组织学定量分析 VPT 术后根髓 HE 染色的典型例子如图 2 所示,组织病理学定量分析结果如表 2、3 所示,TIMP-1 组根髓炎性细胞反应、根髓组织形态及根髓坏死范围的炎症评分与 NS 组炎症评分之间的差异有统计学意义,TIMP-1 组炎症评分更高 ($P < 0.001$, $P < 0.001$, $P < 0.01$)。结果显

示,与 NS 组相比,TIMP-1 组的根髓组织炎症改变更加明显,且根髓组织的炎症改变随着开放时长及给药时长的增加而逐渐明显。

2.3 免疫荧光染色分析 VPT 术后根髓免疫荧光染色的典型例子如图 3 所示,CD68 免疫荧光强度多因素方差分析见表 4、5。TIMP-1 组根髓组织的

表 2 根髓组织病理学评分多因素方差分析

变异来源	评分一					评分二					评分三				
	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
药物 (TIMP-1/NS)	2.604	1	2.604	21.696	<0.001	3.889	1	3.889	22.878	<0.001	7.557	1	7.557	12.543	0.001
开放时长 (24 h/36 h/48 h)	2.425	2	1.213	10.104	<0.001	2.117	2	1.059	6.227	0.004	6.558	2	3.279	5.442	0.008
给药时长 (24 h/48 h)	1.157	1	1.157	9.643	0.003	1.157	1	1.157	6.807	0.013	0.700	1	0.700	1.162	0.288

表 3 根髓组织病理学评分多重比较分析

根髓组织 病理学评分	处理因素	水平		均值差	标准误	均值差 95% CI		P 值
		水平 1	水平 2			下限	上限	
评分一	药物	NS	TIMP-1	-0.462	0.103	-0.669	-0.254	<0.001
	开放时长 (h)	24	36	-0.138	0.125	-0.388	0.113	0.275
		24	48	-0.513	0.125	-0.763	-0.262	<0.001
		36	48	-0.375	0.131	-0.639	-0.111	0.006
	给药时长 (h)	24	48	-0.308	0.103	-0.515	-0.100	0.005
评分二	药物	NS	TIMP-1	-0.550	0.115	-0.782	-0.318	0.000
	开放时长 (h)	24	36	-0.238	0.138	-0.517	0.042	0.094
		24	48	-0.488	0.138	-0.767	-0.208	0.001
		36	48	-0.250	0.146	-0.545	0.045	0.094
	给药时长 (h)	24	48	-0.300	0.115	-0.532	-0.068	0.013
评分三	药物	NS	TIMP-1	-0.767	0.220	-1.210	-0.323	0.001
	开放时长 (h)	24	36	0.250	0.265	-0.284	0.784	0.350
		24	48	-0.625	0.265	-1.159	-0.091	0.023
		36	48	-0.875	0.279	-1.437	-0.313	0.003
	给药时长 (h)	24	48	-0.192	0.219	-0.633	0.249	0.385

表 4 CD68 免疫荧光强度多因素方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
药物 (TIMP-1/NS)	8 331.051	1	8 331.051	110.370	<0.001
开放时长 (24 h/36 h/48 h)	2 374.953	2	1 187.477	15.732	<0.001
给药时长 (24 h/48 h)	2 314.168	1	2 314.168	30.658	<0.001

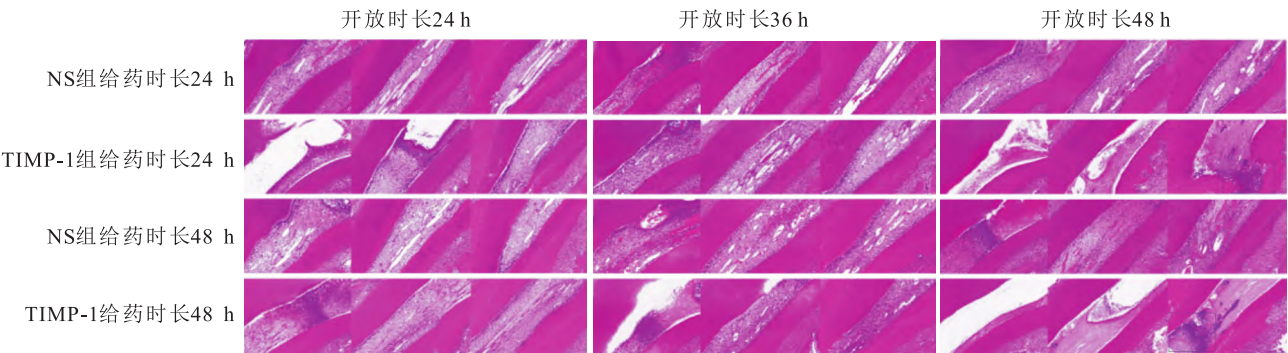


图 2 VPT 术后根髓 HE 染色 ×200

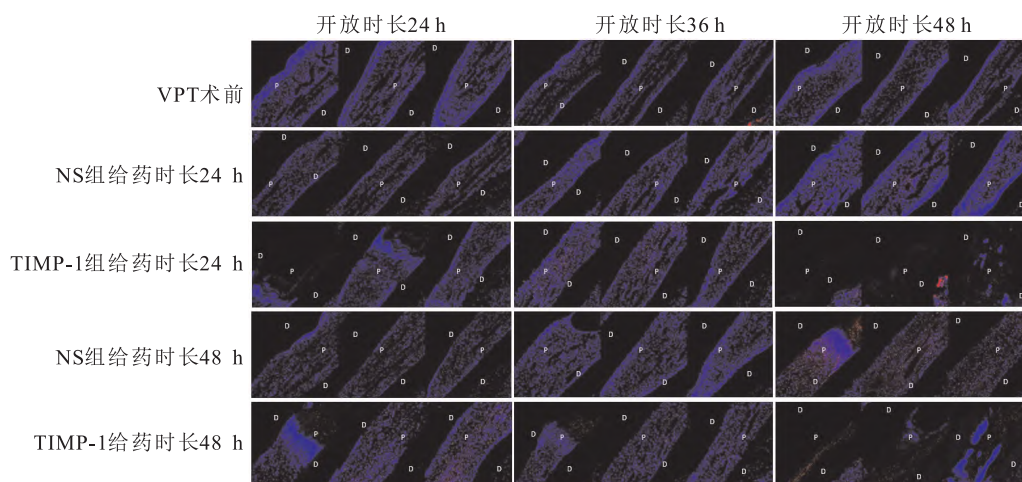


图3 VPT术后根髓免疫荧光染色(CD68标记) ×200

表5 CD68免疫荧光强度多重比较分析

处理因素	水平		均值差	标准误	均值差 95% CI		P 值
	水平 1	水平 2			下限	上限	
药物	NS	TIMP-1	-25.455	2.423	-30.352	-20.558	<0.001
开放时长(h)	24	36	-12.256	2.914	-18.146	-6.367	<0.001
	24	48	-15.135	2.914	-21.025	-9.246	<0.001
	36	48	-2.879	3.072	-9.087	3.329	0.354
给药时长(h)	24	48	-13.416	2.423	-18.313	-8.519	<0.001

CD68免疫荧光标记较NS组明显,荧光强度高于NS组,差异有统计学意义($F = 110.37, P < 0.001$),且随着开放时长及给药时长的延长,根髓组织中的免疫荧光标记强度也逐渐明显增加。

3 讨论

临床上,深龋露髓诊断为不可复性牙髓炎的患牙难以判断细菌及炎症侵入其牙髓组织的深度,因此进行组织学研究具有重要意义。本实验试图寻找一种可行的抗炎药物以提高不可复性牙髓炎VPT成功率,采用了动物实验性牙髓炎模型,模拟临床治疗程序,在炎症牙髓中应用TIMP-1,并进行了组织病理学观察和免疫组化分析,了解VPT术后剩余根髓的炎症进展,为临床治疗提供依据。

TIMP-1是1975年发现的一种分泌分子,是MMP-9的天然抑制剂,通过与MMP-9形成抑制性复合物来防止ECM分解^[2],TIMP-1还可以限制中性粒细胞的过度聚集,以防止活性氧和蛋白酶的过度产生,保护组织免受降解^[7]。此外,TIMP-1还具有细胞因子样活性,参与调节细胞的增殖、凋亡、分化和血管生成^[8]。TIMP-1在人体多种系统的炎症疾病中发挥着重要的作用,例如TIMP-1在哮喘过敏性肺部炎症中发挥调节炎症、参与组织重塑的保护

作用^[9]。TIMP-1与牙周组织的破坏和修复也密切相关,慢性牙周炎患者经牙周治疗后TIMP-1表达增加,提示通过提高TIMP-1的表达可能会改善牙周治疗的结果^[10]。以上研究提示TIMP-1是一个潜在的抗炎药物。

研究显示TIMP-1在一些疾病如哮喘过敏性肺部炎症中发挥抗炎促修复的作用^[9],但是在某些疾病如慢性肝炎中又发挥促炎作用^[11]。Glaab et al^[12]在大鼠毒性研究中发现TIMP1 mRNA的表达上调与组织变性和坏死相关,Kobuch et al^[13]发现TIMP-1水平的升高会导致肝脏中性粒细胞的增加,这些研究结果也与本实验所观察到的TIMP-1加重了牙髓炎的结果相吻合。有研究^[10]显示不同浓度的TIMP-1对体外培养的人牙周膜细胞的增殖与碱性磷酸酶活性表达的影响不同,牙周膜细胞增殖与碱性磷酸酶活性表达随着TIMP-1浓度的增高出现先增高然后又降低的趋势,浓度过高时还会抑制牙周膜细胞增殖与碱性磷酸酶活性表达,推测其浓度可能会影响TIMP-1在炎症中的作用。

本研究采用了一种动物模型。大鼠磨牙牙体组织结构与人类磨牙较为相似,而且其牙髓组织在受到损伤时,炎症与修复过程与人类牙髓组织受损后的反应相似,所以选择大鼠磨牙进行实验的研究

越来越多^[14]。通过髓腔暴露法建立了一个范围明确可控的牙髓炎模型,解决了临床上不能准确评估牙髓炎症范围的治疗难题。此外,本实验还具有一定的创新性,首先由于 TIMP-1 目前在口腔方向应用的研究较少,仅有一项将 TIMP-1 作为盖髓药物在大鼠健康牙髓中应用的实验^[4],在该实验中 TIMP-1 的浓度为 200 ng/ml,本研究作为一项前瞻性的研究就选择了相同的浓度进行实验,但是本实验选取的是牙髓炎症模型,因此在后续实验中可以设置浓度梯度实验,分析 TIMP-1 的浓度是否对其在炎症牙髓中的作用产生影响。其次,该文献应用 TIMP-1 进行盖髓实验时,使用明胶海绵作为载体,吸取 TIMP-1 溶液后盖髓,本实验进行了尝试发现使用明胶海绵会导致玻璃离子充填空间不足或充填后易脱落,因此本实验将这一步改进行成牙髓止血后用吸取 TIMP-1 的无菌棉球覆盖牙髓断面 5 min 进行给药。

参考文献

- [1] Yabluchanskiy A, Ma Y, Iyer R P, et al. Matrix metalloproteinase-9: many shades of function in cardiovascular disease[J]. *Physiology (Bethesda)*, 2013, 28(6): 391–403.
- [2] Bao Q, Niess H, Djafarzadeh R, et al. Recombinant TIMP-1-GPI inhibits growth of fibrosarcoma and enhances tumor sensitivity to doxorubicin[J]. *Target Oncol*, 2014, 9(3): 251–61.
- [3] Mente J, Petrovic J, Gehrig H, et al. A prospective clinical pilot study on the level of matrix metalloproteinase-9 in dental pulpal blood as a marker for the state of inflammation in the pulp tissue[J]. *J Endod*, 2016, 42(2): 190–7.
- [4] Okamoto M, Takahashi Y, Komichi S, et al. Effect of tissue inhibitor of metalloprotease 1 on human pulp cells *in vitro* and rat pulp tissue *in vivo*[J]. *Int Endod J*, 2019, 52(7): 1051–62.
- [5] 李燕珠. 髓腔暴露法构建大鼠实验性牙髓炎模型的研究[D]. 福建:福建医科大学,2019.
- [6] Minic S, Florimond M, Sadoine J, et al. Evaluation of pulp repair after biodentine™ full pulpotomy in a rat molar model of pulpitis[J]. *Biomedicines*, 2021, 9(7): 784.
- [7] Kim K H, Burkhardt K, Chen P, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 deficiency amplifies acute lung injury in bleomycin-exposed mice[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2005, 33(3): 271–9.
- [8] Ries C. Cytokine functions of TIMP-1[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2014, 71(4): 659–72.
- [9] Sands M F, Ohtake P J, Mahajan S D, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 modulates allergic lung inflammation in murine asthma[J]. *Clin Immunol*, 2009, 130(2): 186–98.
- [10] 高晓林. TIMP-1 对人牙周膜细胞增殖及其 ALP 活性表达的影响[D]. 太原:山西医科大学,2010.
- [11] 张健珍,龙英姿,李穗芬,等. 慢性乙型肝炎血清 MMP-1 和 TIMP-1 与肝脏炎症及肝纤维化的相关性[J]. *中国实用内科杂志*, 2007(19): 1520–2.
- [12] Glaab W E, Holder D, He Y D, et al. Universal toxicity gene signatures for early identification of drug-induced tissue injuries in rats[J]. *Toxicol Sci*, 2021, 181(2): 148–59.
- [13] Kobuch J, Cui H, Grünwald B, et al. TIMP-1 signaling *via* CD63 triggers granulopoiesis and neutrophilia in mice[J]. *Haematologica*, 2015, 100(8): 1005–13.
- [14] 李 芳,刘亚军,刘泽婷,等. 绿茶提取物 EGCG 预防龋病的动物实验研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2021, 56(12): 1903–7.

Anti-inflammatory effect of TIMP-1 in irreversible pulpitis in rats

Tang Ying, Li Wuli, Yang Qi, Wang Lu, Li Song

(*Stomatological College of Anhui Medical University, The Affiliated Stomatological Hospital of Anhui Medical University, Key Lab. of Oral Diseases Research of Anhui Province, Hefei 230032*)

Abstract Objective To evaluate the anti-inflammatory effect of tissue inhibitor of metalloprotease (TIMP1) on a rat model of irreversible pulpitis. **Methods** An irreversible pulpitis model was established by pulp exposure on maxillary first molars of 8-10 weeks old male rats, and pulpotomy was performed at 24 h, 36 h and 48 h after pulp exposure, with TIMP-1 covering the pulp section (TIMP-1 group) and saline as control (NS group). Coronal obturation were performed with glass-ionomer cement. Histological and immunohistochemical analysis were performed at 24 and 48 h after administration. **Results** Quantitative histopathological analysis of HE-stained sections showed that the inflammation score (inflammatory cellular response of the root pulp, morphological changes in root pulp tissue and extent of root pulp necrosis) of the pulp were higher in the TIMP-1 group than those in the NS group ($P < 0.001$ or $P < 0.01$). Immunofluorescence staining (CD68-labeled) sections showed that the intensity of CD68 immunofluorescence was higher in the TIMP-1 group than that in the NS group ($P < 0.001$). **Conclusion** TIMP-1 had no anti-inflammatory effect in a rat model of irreducible pulpitis and increased the degree of inflammation in the root pulp.

Key words irreversible pulpitis; vital pulp therapy; tissue inhibitor of metalloprotease 1; pulp exposure