

氦氖激光对退变颞下颌关节 BMP-2 表达的影响

毛凯平, 邹璟, 李解, 姜梦雅, 高桃珍

【摘要】 目的:探讨氦氖激光对退变颞下颌关节细胞外基质调节因子 BMP-2 表达的影响,明确氦氖激光干预颞下颌关节退变的作用机制,为临床运用氦氖激光治疗颞下颌关节骨关节炎提供依据。方法:将骨骼发育成熟的健康成年雄性新西兰大白兔 40 只随机分为正常组、假模型组、模型组和治疗组,每组 10 只,组内又分为造模后第 1d、11d 两个取材时间点。建立颞下颌关节骨关节炎动物模型并行 CT 检查证实造模成功后纳入。治疗组采用氦氖激光照射患侧颊车、上关、下关、听宫、翳风穴,5min/穴/d,共 10d;假模型组仅作关节囊切开后即缝合组织。各组于不同时间点取出颞下颌关节组织,采用 Western Blot 方法检测 BMP-2 的表达水平。结果:Western Blot 检测发现正常组及假模型组不同时间点之间 BMP-2 蛋白表达差异无统计学意义;模型组第 11d BMP-2 表达明显降低;氦氖激光干预 10d 后 BMP-2 表达较第 1d 及模型组明显增加($P<0.05$)。结论:氦氖激光治疗可上调退变颞下颌关节细胞外基质调节因子 BMP-2 蛋白表达,促进细胞外基质合成,从而防治颞下颌关节骨关节炎。

【关键词】 氦氖激光;颞下颌关节退变;BMP-2

【中图分类号】 R49;R782.63 **【DOI】** 10.3870/zgkf.2016.04.001

Effects of He-Ne laser on BMP-2 expression in degenerated temporomandibular joint of rabbits Mao Kaiping, Zou Jing, Li Jie, et al. Department of Stomatology, Wuhan First Hospital, Wuhan 430022, China

【Abstract】 Objective: To observe the effects of He-Ne laser on the expression of BMP-2 in degenerated temporomandibular joint of rabbits, explore its protective role and mechanism in relieving temporomandibular joint degeneration and provide the basis for clinical application of He-Ne laser in the treatment of temporomandibular joint osteoarthritis. **Methods:** Forty New Zealand white rabbits were randomly divided into 4 groups: normal group, sham model group, model group and treatment group, 10 in each group. The specimens were harvested at 1st, and 11th day after modeling. The animal model of temporomandibular joint disease was established by the methods of ChangJia. He-Ne laser was rayed at Jiache, Shangguan, Xiaguan, Tinggong, Yifeng points for 10 days in the treatment group. In the sham model group, the joint capsule was incised and sutured. The animals were killed at 1st, and 11th day and the protein expression of BMP-2 in temporomandibular joints was examined by Western blotting. **Results:** BMP-2 protein expression had no statistically significant difference between different time points in the normal group and the sham model group, but that was up-regulated in the treatment group after He-Ne laser treatment for 10 days. **Conclusions:** He-Ne laser on acupoints may protect the degenerated temporomandibular joint through up-regulating the expression of BMP-2.

【Key words】 He-Ne Laser; temporomandibular joint degeneration; BMP-2

颞下颌关节骨关节炎(temporomandibular joint osteoarthritis, TMJOA)是指颞下颌关节组织发生磨损与变形,并在关节表面形成新骨的非炎症性骨关节炎。由于颞下颌关节结构与功能复杂,加之人的一生

中牙合型不断发生改变,颞下颌关节经历了复杂的改建过程,以致其发病率高达 30%,严重影响患者的生活质量^[1]。细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的降解、组织改建是 TMJOA 最重要的病理改变。文献证实,基质调节因子通过影响细胞外基质降解及合成导致基质成分紊乱及功能改变,在 TMJOA 发生与发展中起着主要作用^[2-7]。氦氖激光是临床治疗 TMJOA 的常用手段之一,但其作用机制尚不完全清楚,本研究通过观察氦氖激光对退变颞下颌关节细胞

基金项目:武汉市卫生科研项目(WX14C03)

收稿日期:2016-03-06

作者单位:武汉市第一医院口腔科,武汉 430022

作者简介:毛凯平(1973-),女,硕士,主治医师,主要从事颞下颌关节骨关节炎方面的研究。

外基质调节因子骨形态发生蛋白-2 (bone morphogenetic protein-2, BMP-2) 表达的影响,以期明确氩氦激光对颞下颌关节退变的保护作用与机制,为临床运用氩氦激光治疗颞下颌关节骨关节病提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料 ①实验动物:选用骨骼发育成熟的健康成年雄性新西兰大白兔 40 只,月龄 5~6 个月,体质量 2~2.5kg,无牙颌畸形,由武汉大学实验动物中心提供(合格证号 42000500002225)。②主要试剂:羊抗兔 BMP-2 单克隆抗体(武汉博士德生物公司,货号:BA0585)、鼠抗羊二抗(KPL 公司)。③主要材料与仪器:PVDF 膜(Millipore 公司)、氩氦激光多功能治疗仪(MDC-500)。

1.2 方 法 ①分组与处理:在标准条件下(武汉市第一医院中心实验室)适应性饲养 3 周后开始实验,实验过程中的程序经过了武汉市第一医院实验动物伦理委员会审批。所有动物进行编号,查随机数字表分为 4 组各 10 只。正常组,自然饲养,不作任何治疗;模型组,模型,不作任何治疗;假模型组,同模型组,但不切除关节盘,不作任何治疗;治疗组,于造模后第 1d 开始氩氦激光治疗,连续治疗 10d。各组分别在造模后第 1 天和 11 天两个时间点各取 5 只,将实验动物以过量注射麻醉药方法处死,取各组髁突,直接冻存于 -80°C 冰箱待检测。②造模:参照常嘉等^[8]的造模方法,建立颞下颌关节骨关节病动物模型。于耳缘静脉注射 1mg/kg 的 2.5g/L 的戊巴比妥钠。无菌条件下自眼外眦外侧 5mm 处至外耳道方向行 2cm 长的皮肤切口,分离皮下组织,暴露关节囊。水平切开关节囊,切开关节盘的外侧附着,将下颌升支推向外侧以充分暴露髁突关节面与关节盘。将关节盘前外二分之一部分切除。无菌生理盐水充分冲洗后将剩余关节盘复位,分层缝合关节囊、皮下组织和皮肤。假模型组仅作关节囊切开后即缝合组织。术后不限制动物的下颌运动,饲养颗粒性常规兔饲料,单笼饲养。连续肌肉注射青霉素 3 天,每天 4 万单位。于术后 1 个月行颞下颌关节 CT 检查,出现典型的 TMJOA 改变即进行后续实验,未出现 TMJOA 改变的动物予以剔除。③治疗方法:采用氩氦激光多功能治疗仪(MDC-500),输出氩氦激光波长 632.8nm,功率 10mw,激光光针光斑直径 2mm。取患侧颊车、上关、下关、听宫、翳风,光针紧贴皮肤并与之垂直,每穴照射 5min,共治疗 10d。

1.3 评 定 标 准 Western Blot 方法进行检测 BMP-2 蛋白表达量:按蛋白分子量配制 10% 的 PAGE 胶电泳,根据预染 marker 显示,充分分离目的蛋白,取出凝

胶用蒸馏水冲洗,剪与 PAGE 凝胶相同大小的 PVDF 膜和滤纸,PVDF 膜用甲醇浸泡数秒后和滤纸一同浸泡于电转缓冲液中。然后用含 5% 脱脂奶粉的 TBST (封闭液)浸泡 PVDF 膜,室温摇床封闭 2h。再加入一抗孵育,TBST 充分洗涤 PVDF 膜 5~6 次,用封闭液稀释相应的 HRP 标记二抗——1:40000 稀释,使 PVDF 膜浸泡于二抗孵育液中,显色曝光。BandScan 凝胶图像分析软件分析胶片灰度值。

1.4 统 计 学 方 法 采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计学分析,数据资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间、组内比较采用方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 模 型 兔 颞 下 颌 关 节 CT 表 现 模型兔于术后 1 个月行三维 CT 检查,显示关节软骨逐渐消耗、丧失,出现缺损,关节软骨表面粗糙,光泽度变差,髁突形态改建、软骨层增厚明显,患侧髁突外观肥大,见图 1A~C。



图 1A~C A 和 B 分别为模型组健侧(左侧)、患侧(右侧)颞下颌关节三维 CT 表现,图 C 为 CT 平扫,可见患侧髁突形态明显改变、软骨层增厚明显,髁突肥大。

2.2 氩氦激光治疗对 BMP-2 表达的影响 Western blot 检测显示,正常组和假模型组各时间点 BMP-2 蛋白表达均无显著性变化;造模成功后第 1d 时间点,模

型组与氩氦激光组 BMP-2 蛋白表达均明显减少,经过氩氦激光治疗 10d 后,BMP-2 蛋白表达较第 1d 及模型组明显上升($P<0.05$)。见图 2,表 1。

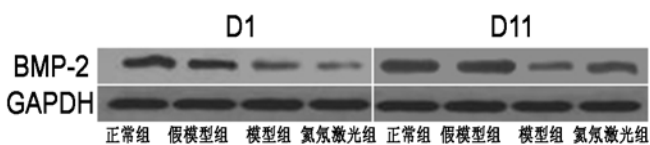


图 2 各组不同时间点 BMP-2 蛋白表达

表 1 BMP-2 蛋白表达相对计量比较 $\bar{x} \pm s$

组别	1d	11d
正常组	1	1.010±0.125
假模型组	1.066±0.191	0.982±0.096
模型组	0.574±0.122 ^a	0.532±0.133 ^a
氩氦激光组	0.506±0.074 ^a	0.736±0.081 ^b

与正常组比较,^a $P<0.05$;与模型组及氩氦激光组第 1d 比较,^b $P<0.05$

3 讨论

尽管颞下颌骨关节病的机制尚未完全阐明,但髁突软骨细胞对基质合成与降解代谢调控的失衡被认为是其主要病理环节^[9]。文献证实,髁突软骨细胞是颞下颌骨关节软骨基质成分的惟一来源,颞下颌骨关节病的发生即为髁突软骨细胞所控制的合成、降解代谢失衡所致,其主要特征为关节软骨细胞外基质成分的进行性降解,同时伴随着继发性炎症因子的释放及其相关效应^[9]。

临床研究表明,氩氦激光对颞下颌骨关节病具有良好的治疗作用^[10],其作用机制值得进一步深入研究。已有研究显示,氩氦激光光针释放出的激光光子能量被病态的生物分子吸收后,可改变病态生物分子内能,这种改变相当于一种刺激源,可直接或间接兴奋神经、肌肉和腺体,同时,可使钾离子致解反应时间显著延长,使五羟色胺物质明显降低,激活内源性吗啡样镇痛物质,延长感觉神经潜伏时间,整合中枢神经的痛觉信号,从而达到镇痛效果,并通过促进新生血管的形成改善颞下颌关节患者局部血液循环,通过抑制固有炎症介质 PGE 的合成及直接抗炎作用,降低炎症反应^[11]。

BMP-2 作为细胞外基质调节因子,同时也是合成代谢酶,可促进细胞外基质合成,并能诱导未分化的间质细胞不可逆的分化为软骨细胞和成骨细胞。对骨组织的发生、损伤和修复都具有重要作用。其对骨原细胞的分化起着决定性作用,是促进成骨的主要因子,可在骨损伤局部和异位促进细胞增殖,提高其碱性磷酸酶活性,是唯一能够单独在异位诱导成骨形成的分子。这使其在骨关节病的临床治疗中具有极大的潜在应用

价值^[12-13]。

综上所述,退变的颞下颌关节组织中,BMP-2 蛋白表达较正常颞下颌关节明显降低,证实了 BMP-2 蛋白表达下降所致 ECM 合成减少是颞下颌关节骨关节病的机制之一。正常组与假模型组之间二者的表达无显著性差异,说明未切除关节盘的颞下颌关节模型无明显的退变。选用氩氦激光照射患侧颊车、上关、下关、听宫、翳风穴 10d 后,颞下颌关节组织中 BMP-2 蛋白表达明显增加,表明氩氦激光治疗可上调退变颞下颌关节细胞外基质 BMP-2 蛋白表达,促进细胞外基质合成,从而防治颞下颌关节骨关节病。本研究为临床运用氩氦激光治疗 TMJOA 提供了一定的理论依据,但氩氦激光影响相关蛋白表达的具体机制仍需进一步研究。

【参考文献】

- [1] 方泽强,马绪臣. 颞下颌关节骨关节病髁突软骨细胞线粒体 DNA 突变的实验研究[J]. 北京大学学报(医学版),2006,38(3):293-297.
- [2] Frederik J. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling[J]. FASEB J,1991,5(8):2145-2154.
- [3] 管剑龙,施桂英,韩星海. 骨关节炎患者血清和滑液中金属蛋白酶 [J]. 中华风湿病学杂志,2001,5(2):102-105.
- [4] Tchertverikov I,Lohmander LS,Verzijl N,et al. MMP protein and activity levels in synovial fluid from patients with joint injury, inflammatory arthritis and osteoarthritis[J]. Ann Rheum Dis, 2005, 64(7):694-698.
- [5] Pelletier JP,Lascau Coman V,Jovanovic D,et al. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase in experimental osteoarthritis is associated with reduction in tissue levels of catabolic factors [J]. J Rheumatol,1999,26(9):2002-2014.
- [6] 闫春哥,景向东,王改玲,等. 兔颞下颌关节骨关节病中基质金属蛋白酶组织抑制剂-1 表达的研究[J]. 临床合理用药,2011,4(7):26-28.
- [7] 周艺群,谷志远. MMPs/TIMPs 的表达调控与颞下颌关节紊乱病的关系[J]. 国外医学口腔医学分册,2004,31(6):424-428.
- [8] 常嘉,马绪臣,武登诚,等. 颞下颌关节骨关节病动物模型的建立及组织病理学观察[J]. 现代口腔医学杂志,2003,17(6):485-488.
- [9] 常嘉,马绪臣,马大龙. 兔实验性骨关节炎髁突软骨细胞表达软骨基质分子的变化及白细胞介素 1 β 的影响[J]. 北京大学学报(医学版),2003,35(5):521-524.
- [10] 涂强. 氩-氦激光光针穴位照射治疗颞下颌关节功能紊乱综合征 37 例[J]. 中国医药指南,2009,7(2):105-106.
- [11] 虞素芳,刘翠云. 氩-氦激光治疗颞下颌关节紊乱综合征 78 例报告 [J]. 激光杂志,1989,10(6):289-290.
- [12] 秦霞南,龙星,李金荣. 颞下颌关节骨关节病的临床诊断[J]. 口腔医学研究,2006,22(2):197-199.
- [13] 秦霞南,龙星,李金荣. 颞下颌关节骨关节病临床病理研究[J]. 口腔医学研究,2005,21(4):440-442.