

[文章编号] 1000-1182(2006)02-0110-03

## 甲状旁腺相关蛋白在大鼠髁突软骨中的表达及其季节性变化规律

李江宁<sup>1</sup>, 陈扬熙<sup>1</sup>, 王正荣<sup>2</sup>

(1.四川大学华西口腔医院 正畸科; 2.四川大学基础医学与法医学院 时间生物学重点研究室, 四川 成都 610041)

**[摘要]** 目的 探讨生长发育期大鼠下颌髁突软骨中甲状旁腺相关蛋白(PTHrP)的表达特征及其季节性变化规律。方法 采用64只SD大鼠, 随机等量分为白天12 h加力组和对照组, 应用免疫组织化学技术检测大鼠下颌髁突软骨中PTHrP的表达, 图像分析半定量研究PTHrP的季节性变化规律, 应用宏观和微观分析法进行统计分析。结果 所有大鼠髁突软骨各层细胞中均有PTHrP的表达, 并有季节性变化规律。戴用功能矫治器后其表达信号增强。冬末春初增强的最明显。结论 生长发育期大鼠下颌髁突软骨中有PTHrP的表达, 且表达呈现季节性变化规律。功能矫形治疗可增加大鼠髁突内源性PTHrP的表达, 冬末春初效果更明显。

**[关键词]** 功能矫治; 甲状旁腺相关蛋白; 季节性节律

**[中图分类号]** R780.2 **[文献标识码]** A

**Seasonal Rhythms of Parathyroid Hormone-related Protein(PTHrP) Expression in Growing Rats after Functional Mandibular Protrusion** Li Jiang-ning<sup>1</sup>, CHEN Yang-xi<sup>1</sup>, WANG Zheng-rong<sup>2</sup>. (1. Dept. of Orthodontics, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Dept. of Biomedical Engineering, School of West China Basic Medicine and Forensic, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

**[Abstract]** **Objective** To study parathyroid hormone-related protein(PTHrP) expression during forward mandibular positioning and compare it with the expression during natural growth in different seasons. **Methods** Sixty-four SD rats were randomly divided into experimental and control groups. Each group were randomly divided into four groups according to seasons. Immunohistochemical(IHC) methods were used to test the protein expression of PTHrP. Macroscopic and microscopic approach were applied to analyze the results. **Results** PTHrP expressed in mandibular condylar cartilage(MCC), the expression was accelerated and enhanced when the mandible was positioned forward. Furthermore, there was a seasonal rhythm in the protein expression of PTHrP in both experimental and control groups. The protein expression in spring group rose more than other groups. **Conclusion** The functional appliance therapy can enhance the protein expression of PTHrP. The enhancement has a seasonal rhythm, which indicates that for the functional treatment better results can be achieved in spring.

**[Key words]** functional treatment; parathyroid hormone-related protein; seasonal rhythms

甲状旁腺相关蛋白(parathyroid hormone-related protein, PTHrP)是软骨内成骨中的主要调节因子, 在胚胎时期及出生后的原发性软骨如长骨的关节软骨等处均有表达<sup>[1]</sup>。但髁突软骨属继发性软骨, 其生长和分化方式不同于原发性软骨。本研究从蛋白水平探讨青春生长高峰期的大鼠髁突软骨中的PTHrP的表达分布情况和戴用功能矫治器后髁突软骨生长改建时PTHrP表达分布的变化特征, 为探讨PTHrP在髁突软骨骨改建活动中的作用机理奠定基础。

**[收稿日期]** 2005-05-17; **[修回日期]** 2005-11-10

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(30371560)

**[作者简介]** 李江宁(1973-), 女, 辽宁人, 主治医师, 博士, 现在首都医科大学口腔医院正畸科工作

**[通讯作者]** 陈扬熙, Tel: 028-85503040

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

羊抗PTHrP多克隆抗体(Santa Cruz公司, 美国); 免疫组化染色SP试剂盒(ZYMED公司, 美国), 包括封闭用血清、二抗、三抗; 其他试剂均为国产分析纯。

#### 1.2 实验分组

选取由四川大学实验动物中心提供的4周龄雄性SD大鼠64只, 体重约90 g, 随机分为对照组和白天12 h加力组, 每组各32只。加力组大鼠戴用自制上颌斜面导板功能矫治器, 引导下颌前伸。矫治器由塑料底板、斜面导板和口外固位臂3部分组成。

选在中国农历的春分、夏至、秋分、冬至4个

时间点及包括其在内的1周时间饲养动物。加力组每天8:00—20:00戴用功能矫治器,对照组不戴。各组动物自由饮水,定时摄食,严格控制饲养条件的同时采用自然光源。饲养1周后,第8天在同一时间处死动物,对照组和加力组,每组每一季节时间点处死8只。

### 1.3 实验标本制备

实验大鼠经股动脉放血处死后,取其右侧髁突软骨,置于4℃预冷的4%多聚甲醛溶液中固定18—24 h, EDTA<sub>2</sub>Na中脱钙1周,梯度乙醇脱水,石蜡包埋。髁突软骨矢状向切片,厚度为4 μm,裱于经APES处理的玻片上,分别做HE染色和PTHrP的免疫组织化学染色。PTHrP免疫组织化学染色的阳性标准为细胞形态完整,结构清晰,细胞胞浆呈特异性棕黄色,阳性细胞着色水平明显高于背景水平。

### 1.4 统计学处理

采用四川大学图形图像研究所研制的Mias2000图像分析系统软件进行分析。每只大鼠选用一张切片,在高倍镜下(×200)进行分析,每张切片在软骨层随机选择3个区域,以交互方式测量出PTHrP的阳性率(阳性率=阳性细胞及间质面积/镜下细胞及间质总面积×100%)。以3次测量值的均值作为该动物在该季节的实测值。采用SPSS11.0统计软件对数据进行分析,分别采用单因素方差分析、*t*检验等常用统计学分析方法和时间生物学分析方法(宏观分析法和微观分析Bingham余弦参数分析法)对两组的各季节甲状旁腺相关蛋白表达的阳性率进行分析。

## 2 结果

### 2.1 甲状旁腺相关蛋白在髁突软骨中的表达

从髁突软骨切片的免疫组织化学染色中可见,所有大鼠下颌髁突软骨中有PTHrP的表达,阳性信号主要位于软骨细胞胞浆内,少部分软骨细胞胞核

中也有阳性信号的表达。PTHrP的阳性表达有空间依赖性,即在软骨的滑膜层、纤维层、成熟层(肥大层)表达较强烈,在生发层、过渡层和移行层表达较弱,此外在软骨膜中也有阳性表达。加力组髁突软骨PTHrP的阳性表达均强于对照组(图1, 2),加力组和对照组中春季标本的阳性表达均强于夏季。



图1 夏季加力组PTHrP在髁突软骨中的表达 SP × 100  
Fig 1 PTHrP expression in condylar cartilage of rats in summer in experimental group SP × 100



图2 夏季对照组PTHrP在髁突软骨中的表达 SP × 100  
Fig 2 PTHrP expression in condylar cartilage of rats in summer in control group SP × 100

### 2.2 宏观统计分析结果

对照组和加力组大鼠髁突软骨中PTHrP表达的季节性变化规律见表1。

表1 对照组和加力组大鼠髁突软骨中甲状旁腺相关蛋白的表达阳性率(%)  
Tab 1 The protein expression of PTHrP in control group and experimental group(%)

分组	季节	每只大鼠髁突软骨中甲状旁腺相关蛋白的表达阳性率								$\bar{x} \pm s$
		1	2	3	4	5	6	7	8	
对照组	春季	103.16	111.02	91.38	75.15	87.55	88.74	87.32	80.21	90.57±11.62
	夏季	73.81	67.27	56.92	65.11	78.06	67.28	60.16	64.90	66.69±6.81
	秋季	74.84	75.07	84.98	74.92	72.94	73.46	69.67	73.35	74.90±4.43
	冬季	78.83	79.34	76.33	79.78	77.96	77.56	78.58	77.32	78.21±1.14
加力组	春季	107.51	106.98	113.32	108.67	103.55	109.15	115.38	110.27	109.35±3.71
	夏季	70.09	69.89	71.12	68.93	69.31	67.02	68.79	69.43	69.32±1.19
	秋季	82.66	69.42	78.46	77.05	79.45	88.53	72.39	78.90	78.36±5.86
	冬季	84.43	86.24	95.21	84.93	82.04	78.82	83.19	92.88	85.97±5.49

表1经t检验表明加力组髁突软骨中PTHrP的表达明显高于对照组,其差异有统计学意义( $P<0.05$ )。经ANOVA检验表明2组中不同季节PTHrP的阳性表达率有显著差异性,春季(冬末春初)表达最高,夏季表达最低。加力组大鼠PTHrP的阳性表达率比对照组均增高,其中春季增加最多,其他3个季节增加的幅度相似。

### 2.3 Bingham余弦参数法分析结果

表1结果经余弦法统计学分析可见对照组和加力组PTHrP表达的季节性变化均符合余弦曲线规律,表明大鼠髁突软骨中PTHrP的表达存在着年节律特征,且戴用功能矫治器后,该节律不会消失。

## 3 讨论

### 3.1 PTHrP在软骨细胞中的表达及其在骨改建中的作用

PTHrP是近年来发现的在软骨内成骨中起关键作用的生长因子,在胚胎时期的麦克尔软骨、发育的髁突软骨中<sup>[2]</sup>和出生后的动物如鸡、大鼠、小鼠的长骨生长盘及人类的软骨组织标本中均有表达,表达主要在增殖层、肥大层、干骺端及周围的软骨膜中<sup>[3-4]</sup>,其表达受时间-空间的影响。另外PTHrP的表达与软骨细胞的分化状态有关,成熟的分化层细胞中含量最少<sup>[5]</sup>。

本研究发现青春生长高峰期的大鼠下颌髁突软骨中有PTHrP表达,阳性信号主要是位于细胞胞浆中,在肥大层的少数细胞中也发现在细胞核中有PTHrP表达。PTHrP的这种表达特点说明它可以通过旁分泌的方式在局部调节软骨内成骨,这支持由Vortkamp等<sup>[6]</sup>提出的PTHrP-Ihh负反馈调节机制,同时肥大软骨细胞层大量PTHrP的表达提示它有独立于Ihh调节通路的作用,可能与延迟软骨细胞的凋亡有关<sup>[7]</sup>。

### 3.2 PTHrP在功能矫治下颌中的作用及其季节性变化规律

研究表明功能矫治器前伸下颌可引起髁突软骨局部的骨钙素、内源性胰岛素等生长因子的活动增强<sup>[8]</sup>。本研究发现PTHrP受机械力刺激后,在髁突软骨局部的表达增强,提示其在功能矫治中,抑制软骨细胞分化的能力增强,从而促进软骨细胞的增殖。

目前研究较多的是有关日节律与正畸牙移动和骨改建的关系<sup>[9]</sup>,但是人体本身还包括月节律、年节律等其他基本节律,且正畸治疗是一个相对漫长的过程,必然要受到这些节律的影响。一些研究表

明,骨的代谢活动存在着年节律的特征,而骨改建活动是功能矫形和牙齿移动的基础,骨代谢的年节律变化必然要影响正畸治疗中的牙移动和骨改建。

本研究发现PTHrP表达阳性率呈现一定的季节性变化规律:春季(冬末初春)表达最强,夏季表达最弱,戴用矫治器后其季节性变化规律并未改变,提示春季开始戴矫治器效果更好。

### [参考文献]

- [1] Lomri A, de Pollak C, Sebag M, et al. Expression of parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) and PTH/PTHrP receptor in newborn human calvaria osteoblastic cells[J]. *Eur J Endocrinol*, 1997, 136(6):640-648.
- [2] Yamazaki K, Suda N, Kuroda T, et al. Immunohistochemical localization of parathyroid hormone-related protein in developing mouse Meckl's cartilage and mandible[J]. *Arch Oral Biol*, 1997, 42(12):784-794.
- [3] Nakase T, Miyaji T, Kuriyama K, et al. Immunohistochemical detection of parathyroid hormone-related peptide, Indian hedgehog, and patched in the process of endochondral ossification in the human[J]. *Histochem Cell Biol*, 2001, 116(3):277-284.
- [4] Medill NJ, Praul CA, Ford BC, et al. Parathyroid hormone-related peptide expression in the epiphyseal growth plate of the juvenile chicken: Evidence for the origin of the parathyroid hormone-related peptide found in the epiphyseal growth plate[J]. *J Cell Biochem*, 2001, 80(4):504-511.
- [5] Pader DB, Rosier RN, Schwarz EM, et al. PTHrP expression in chondrocytes, regulation by TGF-beta, and interactions between epiphyseal and growth plate chondrocytes[J]. *Exp Cell Res*, 2000, 256(2):555-562.
- [6] Vortkamp A, Lee K, Lanske B, et al. Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein[J]. *Science*, 1996, 273(5275):613-622.
- [7] Henderson JE, Amizuka N, Warshawsky H, et al. Nucleolar localization of parathyroid hormone-related peptide enhances survival of chondrocytes under conditions that promote apoptotic cell death[J]. *Mol Cell Biol*, 1995, 15(8):4064-4075.
- [8] 娄新华, 陈扬熙, 罗颂椒, 等. 前伸下颌后大鼠髁突内源性胰岛素含量昼夜节律变化的研究[J]. *华西口腔医学杂志*, 2000, 18(4):252-255.
- [9] LOU Xin-hua, CHEN Yang-xi, LUO Song-jiao, et al. Circadian rhythm changes of the levels of endogenous insulin in growing rat condylar cartilage after functional mandibular protrusion[J]. *West China J Stomatology*, 2000, 18(4):252-255.
- [9] 叶凌, 李江宁, 陈扬熙, 等. 功能矫治前伸下颌后大鼠血中骨钙素含量的昼夜变化规律[J]. *华西口腔医学杂志*, 2001, 19(5):322-324.
- [9] YE Ling, LI Jiang-ning, CHEN Yang-xi, et al. Changes of osteocalcin in serum of yang SD rats after functional protrusion[J]. *West China J Stomatology*, 2001, 19(5):322-324.

(本文编辑 王 晴)