

[文章编号 1000-1182(2005)01-0011-03]

Ⅰ、Ⅱ型胶原及碱性磷酸酶在 鼠胚胎髁突软骨发生中的意义

李晓箐¹, 刘来奎², 易新竹¹, 洪宇娟¹, 韩碧洁¹

(1. 口腔生物医学工程教育部重点实验室, 四川大学, 四川 成都 610041;

2. 南京医科大学口腔医学院 口腔解剖生理学教研室, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的 探讨髁突软骨发生中Ⅰ、Ⅱ型胶原及碱性磷酸酶(ALP)的组织学分布特征及髁突软骨内成骨的分子机制。方法 取14~18 d鼠胚, 分别行Ⅰ、Ⅱ型胶原及ALP抗体免疫组织化学染色。结果 胚胎第14天, 髁突形成的位置可见间充质细胞聚集并与骨膜相连, 间充质细胞及骨膜中Ⅰ型胶原及ALP阳性; 第15天, 肥大软骨细胞中Ⅰ型胶原表达阳性, 其周围的间充质细胞中Ⅰ、Ⅱ型胶原阳性, ALP在两种细胞中均呈阳性; 第16天, 软骨膜、纤维层间充质细胞至肥大软骨细胞上层中Ⅰ型胶原表达阳性, 多形细胞层下方至肥大软骨细胞下层中Ⅰ型胶原表达阳性, Ⅱ型胶原仅表达于肥大软骨细胞, ALP在软骨膜及肥大软骨细胞中呈阳性, 但在多形细胞层呈阴性或弱阳性。结论 髁突软骨的发生机制与长骨不同, 其软骨内成骨的早期Ⅰ、Ⅱ型胶原均有表达, 可能始发于ALP阳性的下颌骨膜间充质细胞。

[关键词] 髁突; 软骨; 胶原; 碱性磷酸酶

[中图分类号] R 780.2 [文献标识码] A

The Distribution of Collagen I, II, and Alkaline Phosphatase in the Development of Condylar Cartilage of Fetal Mouse Mandible LI Xiao-qing¹, LIU Lai-kui², YI Xin-zhu¹, HONG Yu-juan¹, HAN Bi-jie¹. (1. Key Laboratory of Oral Biomedical Engineering Ministry of Education, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Dept. of Oral Anatomy and Physiology, College of Stomatology, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective** The purpose of this study was to investigate the distribution of collagen I, II, alkaline phosphatase (ALP) and their roles during initiation of condylar cartilage of the fetal mouse. **Methods** Coronal sections of mandible of mouse embryo aged from 14th to 18th day were studied under light microscope after stained by immunohistochemical method with antibody of types I, II, collagen and ALP. **Results** On the 14th day of mouse embryo, it was found that mesenchymal cells condensation continuous with the periosteum. Type I collagen and ALP were positive behind the terminal of the ossifying mandibular periosteum where future condylar will form. On the 15th day, positive staining for types I, II collagen was found in mesenchymal cells around hypertrophic cells and type I collagen was detected in hypertrophic cells. ALP was positive in both mesenchymal cells and hypertrophic cells. On the 16th day, type I collagen was observed from periosteal osteogenic cells and mesenchymal cells of the fibrous cell layer to the upper hypertrophic cell layer while Type II collagen was restricted from the lower polymorphic cell layer to the bottom of the hypertrophic cell layer. Type I collagen was positive in the hypertrophic cell layer. ALP was positive in periosteal osteogenic cells and hypertrophic chondral cells, but not in the polymorphic cell layer. **Conclusion** Development of condylar cartilage is different from that of limb bone. Types I, II collagen are expressed in the condylar chondrocyte on the early stage of endochondral ossification. The histology evidence supports the conjecture that condylar cartilage is derived from differentiated mesenchymal cells of the preperiosteum or periosteum of the mandible where ALP is positively expressed.

[Key words] condylar; cartilage; collagen; alkaline phosphatase

髁突软骨是颞下颌关节生理性改建及损伤修复的基础。胚胎时期骨架的发生与出生后骨架生理性改建及损伤修复的分子机制相似, 但不同组织来源软

骨组织的改建修复机制不尽相同, 因此研究胚胎髁突软骨的发生机制对临床上软骨及关节病变机理的认识及治疗有重要意义。目前对四肢关节软骨、生长板软骨发生的研究较为深入, 而下颌髁突软骨是来源于胚胎时期下颌骨骨膜还是独立的始基仍存在争议¹。本实验采用组织学及免疫组织化学方法, 探讨Ⅰ、Ⅱ型胶原及碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)在

[收稿日期 2004-07-28; 修回日期 2004-11-08]

[基金项目] 四川大学青年科学基金资助项目(0040305505007)

[作者简介] 李晓箐(1971-), 女, 云南人, 主治医师, 硕士

[通讯作者] 易新竹, Tel: 028-85501438

髌突软骨发生中的意义以及髌突软骨内成骨的分子机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物和标本的获取

实验动物由四川大学华西医学部动物中心提供。选 6~7 周(青春期)、150~200 g 的 Wistar 大鼠,晚 8 时至次日 8 时雌雄合笼,清晨观察阴道栓出现作为怀孕的标志。胚胎第 14~18 天每日上午 10 时取孕鼠处死,取出胎鼠,PBS 冲洗,于体式显微镜下切取下颌,于 4%多聚甲醛中固定 24 h,然后于 10%的 EDTA 中 4℃脱钙 1 周。常规脱水包埋,作平行髌突长轴的连续冠状切片(5 μm),置于 2%的 3-氨基三乙氧基硅烷处理的玻片上备用。

1.2 组织学染色及免疫组化染色

1.2.1 组织学染色 取不同发育阶段的髌突组织行苏木精-伊红染色。

1.2.2 免疫组化染色 切片常规二甲苯脱蜡,梯度酒精置换二甲苯,3%过氧化氢消除内源性过氧化物酶活性。高压锅抗原修复后滴加正常山羊血清封闭液 37℃孵育 20 min,弃去多余液体(不洗),滴加Ⅰ、Ⅱ型胶原及 ALP 一抗(兔抗多克隆抗体,武汉博士德生物有限公司),37℃孵育 2 h;按 SP 免疫组化试剂盒(北京中山公司)要求分别加入二抗和三抗,PBS 冲洗,DAB 显色,苏木素复染。以 PBS 代替一抗作为阴性对照。细胞浆内有均匀棕色为染色阳性。

2 结果

胚胎第 14 天,苏木精-伊红染色见钙化下颌体末端的后方间充质细胞聚集,并与骨膜相连;骨膜末端与间充质细胞之间有骨样组织出现,一层小圆细胞包绕于其外层(图 1)。免疫组化染色见Ⅰ、Ⅱ型胶原阴性,而间充质细胞及与之相连的骨膜中Ⅰ型胶原、ALP 染色阳性(图 2、3)。

胚胎第 15 天,下颌体后方聚集的间充质细胞显得相当肥大,形成肥大软骨细胞。此细胞中Ⅰ型胶原表达呈阳性,其周围的间充质细胞中Ⅰ、Ⅱ型胶原阳性,ALP 在两种细胞中均呈阳性。

胚胎第 16 天,HE 染色可清晰地观察到髌突软骨的 4 层结构:纤维层、多形细胞层、扁平细胞层、肥大细胞层。免疫组化染色可见从包绕软骨组织的软骨膜、纤维层间充质细胞至肥大细胞层上层Ⅰ型胶原表达阳性;从多形细胞层下方至肥大细胞层下层Ⅰ型胶原表达阳性;Ⅱ型胶原仅表达于肥大细胞层;ALP 在

软骨膜及肥大细胞层中呈阳性,在多形细胞层呈阴性或弱阳性(图 4~6)。

胚胎第 17~18 天,Ⅰ型胶原、ALP 的分布与第 16 天相似,Ⅱ型胶原在肥大细胞层下层中的表达逐渐消失。



图 1 胚胎第 14 天下颌体末端骨膜处间充质细胞聚集 HE ×100

Fig 1 On the 14th day of pregnancy, condensation of mesenchymal cell formed the anlage of future articular process HE ×100

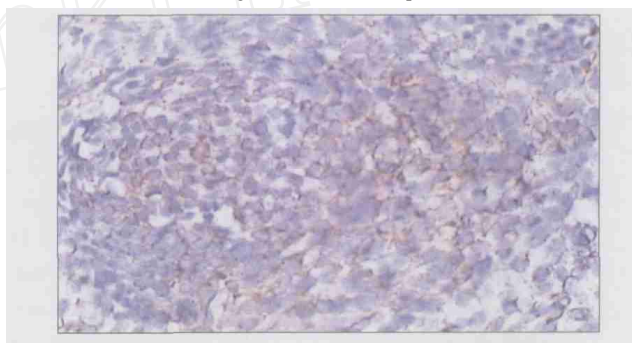


图 2 胚胎第 14 天下颌体末端骨膜处间充质细胞Ⅰ型胶原表达阳性 SP ×400

Fig 2 On the 14th day of pregnancy, immunostaining for type I collagen was detected around the cells of future articular process SP ×400

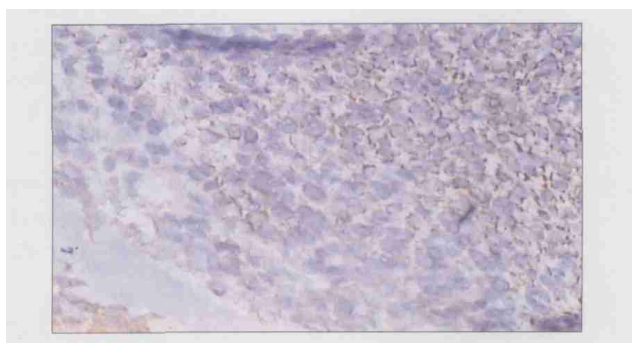


图 3 胚胎第 14 天下颌体末端骨膜处间充质细胞 ALP 表达阳性 SP ×400

Fig 3 On the 14th day of pregnancy, immunostaining for ALP was detected around the cells of future articular process SP ×400



图 4 胚胎第 16 天软骨膜、纤维层间充质细胞至肥大细胞层上层中 型胶原表达阳性 SP $\times 100$

Fig 4 On the 16th day of pregnancy, immunostaining for type collagen was detected around the cells of periosteal, fibrous mesenchymal cells and hypertrophic chondrocytes SP $\times 100$

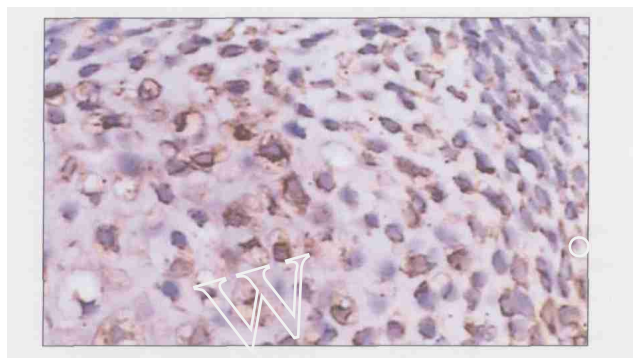


图 5 胚胎第 16 天从多形细胞层下方至肥大细胞层下层中 型胶原表达阳性 SP $\times 400$

Fig 5 On the 16th day of pregnancy, immunostaining for type collagen was detected around the cells of under layer of the polymorphic and hypertrophic chondrocytes zones SP $\times 400$

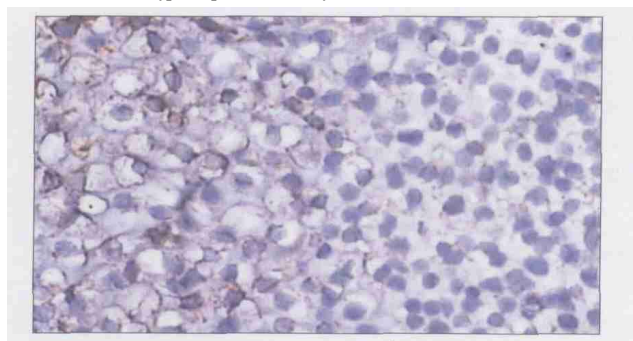


图 6 胚胎第 16 天肥大细胞层 型胶原表达呈阳性 SP $\times 400$

Fig 6 On the 16th day of pregnancy, immunostaining for type collagen was detected around the hypertrophic chondrocytes SP $\times 400$

3 讨论

下颌髁突软骨为继发性软骨,其发生与原发骨骨不尽相同,是来源于下颌体末端的骨膜还是形成于独立的始基,目前仍有争论^{1,2}。髁突由纤维软骨构成,其他大多数关节软骨由透明软骨构成,二者的发

生机制及构成有所不同:肢体软骨细胞主要表达 型胶原, 型胶原仅表达于肥大软骨细胞³;而髁突软骨内成骨的早期 、 、 型胶原均有表达。造成这种不同的原因可能是肢体软骨来源于未分化的间充质细胞,而髁突软骨来源于已分化的下颌骨后端骨膜组织^{4~7}。

本研究显示在软骨形成的早期,邻近下颌骨膜后端的骨膜细胞及间充质细胞中 型胶原阳性,随后肥大软骨细胞周围的间充质细胞 、 型胶原均呈阳性。 型胶原是骨基质的主要成份,其他类型的细胞如软骨前体细胞也有表达⁸; 型胶原是软骨细胞形成的特异性标志(角膜细胞除外)。 、 型胶原的表达预示着此处细胞具有形成软骨的潜力,因此本研究结果支持髁突软骨来源于下颌骨后端骨膜或前骨膜组织。

ALP在肢体软骨内成骨过程中表达于肥大软骨细胞及骨形成细胞,可作为这类细胞的标志。鼠胚第 14 天,软骨仍未形成,但未来髁突始基处的间充质细胞 ALP 阳性;第 15~16 天新形成的软骨细胞中 ALP 也呈阳性,因此支持髁突软骨来自 ALP 呈阳性的下颌前骨膜或骨膜样组织中的间充质细胞^{6,7}。

综上所述,髁突软骨的发生机制与长骨不同,其形成的早期 、 、 型胶原均有表达,此软骨可能始发于 ALP 阳性的下颌骨膜间充质细胞。

[参考文献]

- 1] Vinkka-Puhakka H, Thesleff I. Initiation of secondary cartilage in the mandible of the Syrian hamster in the absence of muscle function J. Arch Oral Biol, 1993, 38(1): 49-54.
- 2] Shibata S, Suzuki S, Tengan T, et al. A histological study of the developing condylar cartilage of the fetal mouse mandible using coronal sections J. Arch Oral Biol, 1996, 41(1): 47-54.
- 3] Linsenmayer TF. Collagen: in cell of extracellular matrix M. 2nd ed. New York: Plenum Press, 1991: 7-44.
- 4] Ishii M, Suda N, Tengan T, et al. Immunohistochemistry findings type and type collagen in prenatal mouse mandibular condylar anlage compared with the tibial anlage J. Arch Oral Biol, 1998, 43(5): 545-550.
- 5] Fukada K, Shibata S, Suzuki S, et al. In situ hybridization study of type 、 、 collagens and aggrecan mRNAs in the developing condylar cartilage fetal mouse mandible J. J Anat, 1999, 195(3): 321-329.
- 6] Miyake T, Cameron AM, Hall BK. Stage-specific expression patterns of alkaline phosphatase during development of the first arch-skeletal in inbred C57BL/6 mouse embryos J. J Anat, 1997, 190(2): 239-260.
- 7] Lee SK, Kim YS, Oh HS, et al. Prenatal development of the human mandible J. Anat Rec, 2001, 263(3): 314-325.
- 8] Castagnola P, Dozin B, Mbro G, et al. Changes in the expression of collagen genes show two stages in chondrocyte differentiation *in vitro* J. J Cell Biol, 1988, 106(2): 461-467.

(本文编辑 王 晴)