

[文章编号 1000-1182(2004)01-0073-04]

颌间 类矫形力作用下转化生长因子 1 在髁突软骨中的基因表达

李 煌, 徐 芸, 李 松, 尹 康, 吴拓江
(昆明医学院口腔医院 正畸教研室, 云南 昆明 650031)

[摘要] 目的 观察颌间 类矫形力不同作用时间下转化生长因子 1(TGF-1)在髁突软骨中的基因表达。方法 选用青春生长发育期雌性恒河猴 6 只, 随机分为 3、6 月实验组和对照组, 实验组戴用颌间 类双阻板磁力矫治器, 对照组不戴。苏木精—伊红染色观察髁突软骨组织形态, 原位杂交方法检测髁突软骨 TGF-1 mRNA 的表达, 并进行统计学处理。结果 组织学观察表明: 与对照组相比 3 月组髁突软骨前份有一定程度增厚, 中、后份变薄; 6 月组髁突软骨厚度变化与 3 月组相似。原位杂交结果表明: 对照组 TGF-1 mRNA 前份表达较弱, 中、后份表达较强; 3 月组髁突软骨前中后份 TGF-1 mRNA 表达均增强, 以前份最强; 6 月组髁突软骨 TGF-1 mRNA 表达比 3 月组明显减少, 但前份仍强于中后份。实验组之间以及实验组与对照组之间的差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。结论 髁突软骨 TGF-1 mRNA 的表达强弱与颌间 类矫形力不同的作用时间有关。3 月组 TGF-1 mRNA 表达较 6 月组明显, 提示 3 月组髁突软骨改建较活跃。

[关键词] 恒河猴; 安氏 类错骀; 髁突软骨; 转化生长因子-1

[中图分类号] R 783.5 [文献标识码] A

The Expression of TGF-1 mRNA in Pubescent Rhesus Monkeys Condyle under Class Intermaxillary Functional Orthopedic Force LI Huang, XU Yun, LI Song, YIN Kang, WU Tuo-jiang. (Dept. of Orthodontics, College of Stomatology, Kunming Medical College, Kunming 650031, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of TGF-1 mRNA in pubescent Rhesus monkeys condylar under Class intermaxillary functional orthopedic force for different lengths of time. **Methods** Six pubescent Rhesus monkey were divided into two test groups and a control group. Monkeys in the test groups wore TMA while the control groups did not. Histological method (HE staining) and in situ hybridization were employed in this study. **Results** The histological results showed that, compared with the control group, the anterior part of the condyle became thicker while the median part and the posterior part became thinner in 3 months group. However, in 6 months group, the change was similar to 3 months group. The results of in situ hybridization showed that, in control group, TGF-1 mRNA mildly expressed in the anterior part of the condyle while extensively in the median and posterior parts. In 3 months group, TGF-1 mRNA expressed in all parts of condyle; the most intensive expression was in the anterior part. Compared with 3 months group, the expression of TGF-1 mRNA decreased in 6 months group, but the expression in anterior part was stronger than in median and posterior parts. **Conclusion** Under Class Orthopedic therapy, TGF-1 mRNA probably participated in the endochondral bone remodeling in the condyle, and the expression was closely related to loading time. In 3 months group, the expression of TGF-1 mRNA was stronger than that in 6 months group. It was inferred that the remodeling of endochondral bone was more active in 3 months group.

[Key words] Rhesus monkeys; class occlusion; condyle; transforming growth factor-1

青少年 类错骀的矫治临床已广泛开展, 目前认为其机制是通过矫形力刺激髁突软骨的改建, 以达到骨形态和位置的调整, 但相关基础研究报道较少。近年研究发现多种细胞因子在软骨改建中具有调节作用。转化生长因子-1 (transforming growth factor, TGF-1) 是骨形态发生过程中的重要调节因子, 与骨及软骨

生长有密切的关系^{1~5}。实验证明 TGF-1 可启动骨和软骨的形成, 调节成骨细胞及成软骨细胞的分化, 加速成骨过程; 同时它还调节破骨细胞功能, 对其他激素及生长因子有调控作用。因此在骨及软骨组织中 TGF-1 量的多少, 可提示受检测部位成骨和成软骨的活跃程度。目前已发现 5 种 TGF-1, 其中 TGF-1 最具有代表性, 它对髁突软骨细胞的生物学效应最为明显。国内学者对功能矫形前伸下颌进行了不少基础研究, 但对功能矫形下颌后退的机制研究较少。本研究采用原位杂交方法检测颌间 类矫形力不同作用

[收稿日期 2002-09-25; 修回日期 2003-08-20]

[基金项目] 云南省自然科学基金资助项目 (39670785)

[作者简介] 李 煌 (1976-), 女, 江西人, 博士

[通讯作者] 徐 芸, Tel: 0871-5338944

时间下 TGF-1 在髌突软骨中的表达, 以期为进一步研究提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物分组和动物模型的建立

实验动物分组和动物模型的建立见参考文献⁶。

1.2 主要试剂

TGF-1 生物素化探针和高敏原位杂交试剂盒 (Maxim 公司, 美国), APES 粘片剂 (福建迈新公司), 其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.3 取材及标本处理

分别于实验加力 3 月、6 月后行氯胺酮麻醉, 股动脉放血处死实验猴 2 只, 对照猴 1 只。用 4% 多聚甲醛行颈总动脉灌注固定, 取下完整颞下颌关节标本置 0.5 mol/L EDTA 脱钙, 每日更换新鲜脱钙液。脱钙 1 周后用手术锐利刀片沿髌突中份矢状面剖为两半, 修剪多余组织至 1.5 mm × 1.5 mm × 1.5 mm 大小, 继续脱钙。脱钙至针尖可以刺破骨皮质为止。常规石蜡包埋, 经髌突中份作矢状连续切片, 片厚约 4 μm, 苏木精-伊红染色。

1.4 原位杂交步骤

TGF-1 生物素化探针用杂交液稀释 20 倍, 杂交前 95℃ 变性 5 min, 立即冰上淬灭。石蜡切片经脱蜡至 DEPC 水, 10 mg/L 蛋白酶 K 消化 30 min, 梯度乙醇脱水, 37℃ 烤箱干燥 5 min。每张切片滴加一滴探针, 用专用盖玻片小心覆盖, 避免产生气泡。80℃ 烤箱继续变性 10 min, 42℃ 湿盒内反应过夜。将玻片放于去垢液浸泡至玻片脱落, 蛋白封闭液充分洗涤减少非特异性结合; 滴加 RNase 酶消化未结合上的探针, 充分洗涤后加入连接物, 显色约 2 h, 镜下观察阳性细胞出现紫蓝色后, 自来水冲洗终止显色反应。常规脱水透明, 封片。实验中设立无探针空白对照, 用 RNA 酶处理的切片为阴性对照。标本制作过程的各个步骤应注意避免核糖核酸酶污染。

1.5 图像分析

采用中国华海生产的 HIPAS-1000 高清晰医学图像分析软件进行分析。对照组和实验组左右侧关节分别选取切片 10 张, 每张切片在高倍镜下 (×200) 按髌突软骨前、中、后份分别随机选择 2 个视野, 彩色, 测量出被视视野中 TGF-1 mRNA 表达的阳性率 (阳性率 = 阳性细胞面积/镜下细胞及间质总面积 × 100%), 以 2 次测量值的均值作为该动物髌突软骨不同部位和不同层次的实测值。

1.6 统计分析

采用 SPSS 9.0 统计学软件包用方差分析进行比较, 如有显著性差异再进行两两比较的 q 检验。

2 结果

2.1 组织学观察

对照组髌突软骨表面完整, 各层次清楚连续, 由表及里依次为纤维层、增殖层、前肥厚层、肥厚层、钙化软骨层。与对照组相比, 3 月组髌突软骨前份有一定程度增厚; 中后份生长受到抑制, 后份明显变薄。6 月组髌突软骨变化与 3 月组相似, 但前份增厚不如 3 月组明显。

2.2 原位杂交结果

阳性细胞在高倍镜下呈紫蓝色颗粒。对照组髌突软骨 TGF-1 mRNA 以肥厚层和钙化软骨层表达为主, 前份表达较少, 中、后份表达较强。3 月组髌突软骨各部份 TGF-1 mRNA 表达较对照组明显增多, 阳性信号增强。前份阳性细胞率最高, 见紫蓝色颗粒分布在特定的区域, 以肥厚层和钙化软骨层表达最强; 后份 TGF-1 mRNA 表达以前肥厚层和肥厚层为主, 中份以上 3 层均有表达。6 月组髌突软骨 TGF-1 mRNA 表达信号明显少于 3 月组和对照组, 但前份表达仍强于中后份, 其表达以肥厚层和钙化软骨层为主 (图 1)。

图像分析结果见表 1 和 2, 方差分析和 q 检验结果见表 3。3 月组与对照组相比, 增殖层和中、后份的钙化软骨层差异无统计学意义, 其余各层差异均有统计学意义; 6 月组与对照组相比除增殖层外其余各层差异均有统计学意义; 6 月组与 3 月组相比除增殖层外其余各层差异均有统计学意义。

3 讨论

3.1 组织学观察

研究发现向后牵引下颌骨时, 髌突表面应力分布为前面形成张应力, 后上部出现压应力⁷。本研究结果显示, 3 月组髌突软骨前份增厚, 中后份生长受到抑制, 提示髌突软骨发生了适应性改建, 髌突软骨前份受到牵张力, 成软骨细胞增生活跃, 软骨厚度有一定增加; 中后份受到压力, 软骨细胞增生受到抑制而变薄, 这与以上研究结果一致。

3.2 颌间 类矫形力作用下髌突软骨 TGF-1 mRNA 的表达规律

Graber 等⁸ 的颌面生长伺服系统理论认为, 髌突的生长改建受内分泌调控, 生长激素—生长介素复合体对髌突软骨的生长有直接和间接的作用。作为生长区之一, 髌突软骨内成骨是下颌生长发育的主要形式, 肥厚层细胞分泌软骨基质, 并不断分化成钙化软

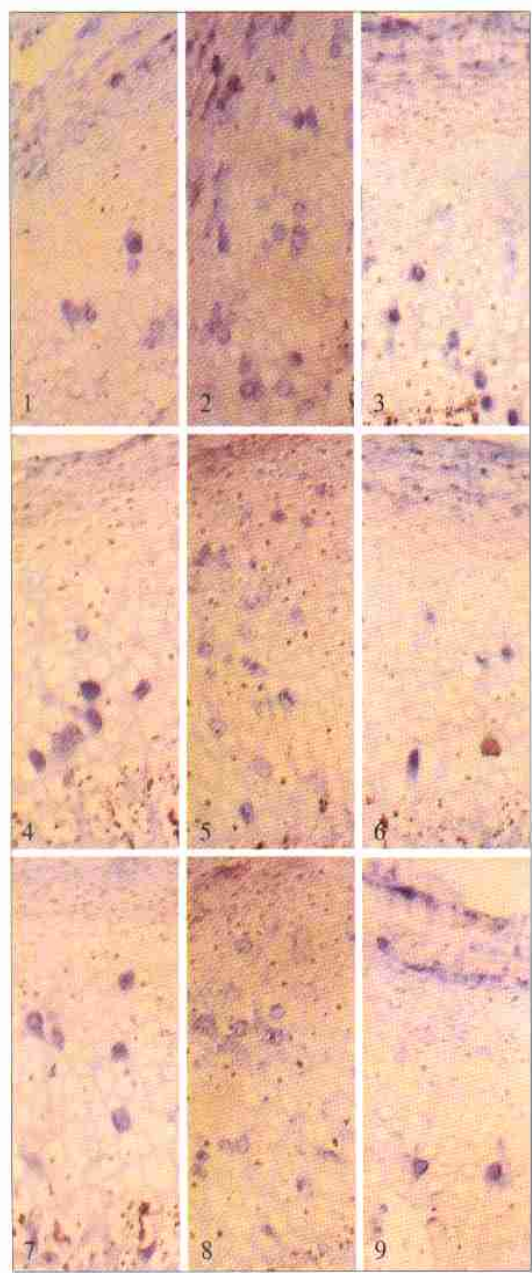


图 1 髁突软骨 TGF-1 mRNA 表达 ISH $\times 200$
1:对照组前份,2:3 月组前份,3:6 月组前份;
4:对照组中份,5:3 月组中份,6:6 月组中份;
7:对照组后份,8:3 月组后份,9:6 月组后份。

Fig 1 The expression of TGF-1 mRNA ISH $\times 200$

骨层细胞,钙化软骨层细胞再不断钙化成骨,使下颌骨向前向下生长,髁突软骨前份不断吸收,中后份增生。TGF-1 mRNA 表达规律与髁突的正常生长发育规律相符,主要表达在肥厚层和钙化软骨层,中后份表达强于前份,这提示在正常功能状态下,TGF-1 mRNA 可能主要通过对软骨钙化成骨的调控参与髁突软骨的发育和生长改建。

Dodds 等⁹ 研究发现 TGF-1 在早期增生的、成熟的软骨细胞上有表达,他认为 TGF-1 是关节软骨改建中的重要因子之一。李小兵等¹⁰ 研究证实 TGF-1 在髁突成熟层、钙化软骨层表达增加,提示 TGF-1 可能具有局部功能刺激作用。本研究表明 3 月组 TGF-1 mRNA 表达明显增强。髁突软骨在矫形力作用下前份受张力牵拉,TGF-1 mRNA 表达以肥厚层和钙化软骨层最强,其主要原因是 TGF-1 诱导软骨细胞不断成熟,软骨骨化增生成新骨,这不仅与组织学结果相符,也与李小兵等研究结果有类似之处。而在压力区,髁突软骨中、后份 TGF-1 mRNA 表达增多,以前肥厚层和肥厚层为主,其原因可能与 TGF-1 的双重效应有关⁷。它不仅能刺激成骨和成软骨细胞增生,还能调控破骨细胞的分化增殖。因此,可以推测 TGF-1 mRNA 和其他因子共同作用调控软骨的改建。

胡静等¹¹ 研究认为 TGF-1 参与了下颌骨牵张成骨过程,并在早期表达。本研究也证实了 TGF-1 表达的时间性差异。本研究根据临床矫治作用时间分为 3 月和 6 月组,通过控制磁块间距来维持一持续作用力。3 月组力学刺激较强且恒定,能够积极促进 TGF-1 的合成和分泌。而在 6 月组,由于磁块间距后期增加缓慢,矫形力维持在一相对恒定较弱的范围,机体逐渐适应了局部应力环境水平,组织反应减弱。此外,TGF-1 以自分泌和旁分泌形式对骨及软骨代谢中相关细胞进行调节,且存在负反馈调节机制,这可能也是下颌骨矫形进入缓慢期后 TGF-1 mRNA 染色逐渐减弱的原因之一。

TGF-1 mRNA 不仅参与髁突的正常生长发育,而且在颌间 类矫形力作用下发挥重要的作用,其表达

表 1 3 月组髁突软骨 TGF-1 mRNA 表达阳性细胞率(%, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1 The postive rate of the expression of TGF-1 mRNA in the 3-month group(%, $\bar{x} \pm s$)

髁突分层	3 月对照组(1)			3 月实验组(2)		
	前份	中份	后份	前份	中份	后份
增殖层	10.58 ± 2.12	13.62 ± 1.94	15.92 ± 3.58	12.46 ± 2.24	16.95 ± 3.38	10.14 ± 2.85
前肥厚层	9.52 ± 4.67	12.43 ± 2.77	32.91 ± 6.39	68.06 ± 8.75	67.30 ± 6.54	99.37 ± 11.16
肥厚层	35.98 ± 6.52	56.06 ± 4.19	61.56 ± 4.63	120.62 ± 9.75	94.63 ± 6.34	93.66 ± 9.71
钙化软骨层	34.83 ± 7.88	63.98 ± 6.11	55.56 ± 6.35	128.44 ± 8.46	65.60 ± 8.83	46.04 ± 7.39

表 2 6 月组髁突软骨 TGF- 1 mRNA 表达阳性细胞率(%, $\bar{x} \pm s$)

Tab 2 The postive rate of the expression of TGF- 1 mRNA in the 6-month group(%, $\bar{x} \pm s$)

髁突分层	6 月对照组(3)			6 月实验组(4)		
	前份	中份	后份	前份	中份	后份
增殖层	11.41 \pm 2.24	13.72 \pm 2.15	14.54 \pm 4.01	7.33 \pm 1.46	10.61 \pm 2.93	7.77 \pm 1.32
前肥厚层	18.32 \pm 4.34	12.17 \pm 3.13	32.88 \pm 7.21	27.83 \pm 4.66	26.38 \pm 2.54	9.32 \pm 2.31
肥厚层	37.56 \pm 7.04	54.21 \pm 4.69	59.83 \pm 4.76	66.74 \pm 7.42	23.27 \pm 5.86	13.38 \pm 5.28
钙化软骨层	36.27 \pm 8.81	65.96 \pm 6.22	53.83 \pm 6.31	50.92 \pm 7.83	20.89 \pm 4.61	17.25 \pm 6.29

表 3 TGF- 1 mRNA 表达的方差分析和 q 检验结果

Tab 3 The results of AVON analysis and q test

髁突分层	(1)和(2)			(3)和(4)			(2)和(4)		
	前份	中份	后份	前份	中份	后份	前份	中份	后份
增殖层	/	/	/	/	/	/	/	/	/
前肥厚层	**	**	**	*	*	**	**	**	***
肥厚层	***	**	**	**	**	**	**	**	***
钙化软骨层	***	/	/	*	**	**	**	**	**

*为 $P<0.05$, **为 $P<0.01$, *** 为 $P<0.001$, /为 $P>0.05$

强弱与不同作用时间的矫形力有关。3 月组 TGF- 1 mRNA 表达较 6 月组增强,提示此期髁突生长改建较活跃。当然,髁突的改建有赖于局部多种细胞因子的调控,其他因子如何发挥作用尚有待于进一步研究。

[参考文献]

1] Koseki T, Gao Y, Okahashi N, et al. Role of TGF-beta family in osteoclastogenesis induced by RANKL J. Cell Signal, 2002, 14(1): 31-36.

2] Yeung HY, Lee KM, Fung KP, et al. Sustained expression of transforming growth factor-beta by distraction during distraction osteogenesis J. Life Sci, 2002, 71(1): 67-79.

3] Ogata T. Fluid flow-induced tyrosine phosphorylation and participation of growth factor signaling pathway in osteoblast-like cells J. J Cell Biochem, 2000, 76(4): 529-538.

4] Gassner RJ, Buckley MJ, Studer RK, et al. Interaction of strain and interleukin-1 in articular cartilage: Effects on proteoglycan synthesis in chondrocytes J. Int J Oral Maxillofac Surg, 2000, 29 (5): 389-394.

5] Baylink DJ, Finkelman RD, Mohan S. Growth factors to stimulate bone formation J. J Bone Miner Res, 1993, 8 (Suppl 2): S565-727.

6] 李 煌,徐 芸,李 松,等.颌间 类矫形力对青春恒河猴颞下颌关节改建作用的影像学研究 J. 华西口腔医学杂志, 2003, 21(6): 463-466.

7] 周学军. 下颌骨矫形的应力分布及其影响因素 J. 口腔正畸学, 1998, 5(3): 130-133.

8] Graber TM, Rakosi T, Petrovic AG, et al. Dentofacial orthopedics with functional appliances J. Louis Mosby, 1985, 10(3): 302-310.

9] Dodds RA, Merry K, Littlewood A. Expression of mRNA for IL-1b, IL-6 and TGF beta in developing and cartilage J. J Histochem Cytochem, 1994, 42(6): 733-744.

10] 李 小兵,罗 颂椒,张世宇. 功能性前伸大鼠下颌后髁突软骨转化生长因子 1 表达变化的研究 J. 华西口腔医学杂志, 1998, 16(4): 352-354.

11] 胡 静,李继华,唐正龙,等. 转化生长因子 1 在下颌牵张成骨过程中的表达及意义 J. 华西口腔医学杂志, 2002, 20(2): 141-143.

(本文编辑 汤亚玲)

招聘口腔科医师

因开设连锁门诊和联办口腔大专班,海南京海口腔正畸中心急聘口腔正畸科、牙体牙髓科医师各 5 名,口腔修复科、口腔外科、牙周病科、口腔儿科医师各 3 名,口腔综合科医师 10 名,待遇从优,并可免费海南环岛旅游(包括博鳌亚洲论坛,三亚天涯海角等),聘期一月至一年及多年均可,有意者请将毕业证书、职称证书等复印件寄至海口海甸三西路海南大学医院口腔中心林华功收(邮编:570228),联系电话:(0) 13907566768 林老师