

[文章编号 1000-1182(2005)02-0155-04

颌间 类矫形力下 TGF-1 mRNA 在 青春期恒河猴上颌骨缝中的表达

吴拓江¹, 李松², 徐芸², 李煌¹, 尹康²

(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. 昆明医学院口腔医院 正畸科, 云南 昆明 650031)

[摘要] 目的 检测在颌间 类矫形力不同作用时间下转化生长因子 1(TGF-1)在青春期恒河猴上颌骨周围骨缝中的表达。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。分别于实验后 3 个月、6 个月处死实验猴, 制备组织切片。图像分析系统分析苏木精-伊红染色切片中的骨缝区细胞密度, 原位杂交检测各骨缝中 TGF-1 mRNA 的阳性率。结果 水平组的腭颌缝和垂直组的翼上颌缝的细胞密度, 在组间比较上无差异, 其余各组均有明显差异; 施加矫治力后 TGF-1 mRNA 的表达明显增加, 除颧颞缝和翼上颌缝 6 月实验组和对照组无显著差异外, 其余各实验组和对照组间都有显著差异 ($P < 0.01$), 都表现为实验组表达强于对照组, 3 月实验组表达均强于 6 月实验组。结论 上颌骨缝在颌间 类矫形力牵引下, 发生积极的组织改建。在骨缝改建的不同时期, TGF-1 mRNA 的表达不相同, 这与加力的时间、骨缝对矫形力的差异性反应以及 TGF-1 在不同时期出现的不同生物学效能有关。

[关键词] 转化生长因子-1; 骨缝; 类颌间矫形力

[中图分类号] R 783.5 [文献标识码] A

The Expression of TGF-1 mRNA in the Maxillary Sutures of Puberty Rhesus Loaded with the Class Intermaxillary Orthopedic Force WU Tuo-jiang¹, LI Song², XU Yun², LI Huang¹, YIN Kang². (1. Key Lab. of Oral Biomedical Engineering of Ministry of Education, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Dept. of Orthodontics, College of Stomatology, Kunming Medical College, Kunming 650031, China)

Abstract Objective The purpose of the study is to detect the expression of TGF-1 mRNA in the maxillary sutures of puberty rhesus during different periods of the loading of intermaxillary class orthopedic force. **Methods** The animal model was established with 6 puberty female rhesus, which were randomly divided into experimental group (wearing class twin-block magnet appliance, each 2 rhesus for 3 and 6 month respectively) and control group (not wearing any appliance, each 1 rhesus for 3 and 6 month respectively). Tissue sections were obtained perpendicular to the sutures. In situ hybridization was used to the expression of TGF-1 mRNA, and the expression intensity was measured and statistics was performed by SPSS 11.0. **Results** There were no statistic differences of cellular density between palatomaxillary suture in vertical group and pterygomaxillary suture in horizontal group, but statistic differences were found between other groups. The expression of TGF-1 mRNA was detected in the control group, but the expression intensity was obviously increased after the load of intermaxillary class orthopedic force. Statistically significant differences were found among all groups except the six months experimental group and control group of temporozygomatic sutures and pterygomaxillary sutures. Experimental groups were more intensive than the control group and three months group more intensive than the six months group. **Conclusion** The active tissue remodeling happened in the circummaxillary sutures by the effect of class intermaxillary orthopedic force. Cell proliferation, extracellular matrix synthesis and bone formation were accelerated. During the different remodeling periods, the expression intensities were different, which may be related to the different force loading manners, the different reaction of sutures to the orthopedic force and the different biological function of TGF-1 in the different periods.

Key words transforming growth factor-1; suture; intermaxillary Class orthopedic force

[收稿日期 2004-07-02; 修回日期 2004-10-19

[基金项目] 云南省自然科学基金资助项目 (2002C0023R)

[作者简介] 吴拓江 (1977-), 男, 云南人, 博士研究生

[通讯作者] 徐芸, Tel: 0871-5338944

施加矫形力是临床上用于纠正生长发育期骨骼畸形的常用手段, 对于 类错殆, 尤其是以上颌发育不足为主的早期骨骼畸形, 施加矫形力刺激上颌骨的前生长是一种应用广泛、疗效较为确切的治疗方

法。Graber 等的颅面生长伺服系统理论 (serosystem theory) 认为,骨缝作为继发性生长区,其改建除了与全身因素有关外,生长激素-生长介素复合体对骨缝的生长有直接和间接的调节作用。目前,转化生长因子 1 (transforming growth factor- 1, TGF- 1) 在骨骼改建中的作用受到了学者们极大的关注。它是涉及骨沉积及骨吸收偶联过程的关键细胞激肽之一,具有广泛的生物学效应,目前已知 TGF- 1 有确切的促进成骨细胞的增殖与分化,促进细胞外基质分泌及抑制破骨细胞前体的形成及骨吸收的生物学效应。反之, TGF- 1 水平的检测可反映成骨的活跃程度,有助于探讨颌间 类矫形力对上颌骨周围骨缝的作用机制。本实验以青春恒河猴为对象,检测上颌骨周围骨缝在颌间 类矫形力不同作用时间下的细胞密度变化及 TGF- 1 mRNA 的表达情况。

1 材料和方法

1.1 实验动物分组和动物模型建立

选用云南产的健康生长发育期雌性恒河猴 6 只 (年龄 3 岁, 体重 3 kg, 云南省动物研究所提供), 随机分为: 3 月实验组、6 月实验组 (各 2 只), 3 月对照组、6 月对照组 (各 1 只)。实验组猴配戴自制的双阻扳磁力功能矫治器, 咬合时磁块同极相对, 产生推下颌向后、上颌向前的交互颌间 类矫形力, 方向与殆平面平行, 对照组动物不配戴矫治器。3 月实验组在戴用矫治器 2 周后加磁块 1 次, 6 月实验组在 2 周和 3 月后分别加磁块 1 次。实验动物采用大笼饲养, 定时摄食, 喂全营养合成饲料及水果¹。

1.2 观察对象

将上颌骨周围的腭颌缝、额颌缝、颧颌缝、颧颞缝、翼上颌缝及翼腭缝分为 3 组: 骨缝界面长轴大致与水平面平行的水平组, 有腭颌缝和颧颞缝; 骨缝界面长轴大致与垂直面平行的垂直组, 有额颌缝、翼上颌缝及翼腭缝; 骨缝界面长轴水平面和垂直面都成一角度的斜行组, 有颧颌缝。其中, 翼上颌缝及翼腭缝位置毗邻, 本实验仅对翼上颌缝进行观察。

1.3 主要试剂

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

1.4 取材及标本的制作

分别于实验 3 个月、6 个月后肌注氯胺酮麻醉, 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股动脉放血的灌注固定, 取下完整颅骨标本, 置 4℃ 冰箱多聚甲醛中固定 6 h, 然后置于 37℃ 温箱, 浸泡于 15% 的 0.5 mol/L 的 EDTA 中脱钙, 每日

更换新鲜脱钙液, 脱钙 1 周后用锐利手术刀片修剪多余的组织, 暴露骨缝位置, 逐步脱钙、修剪标本, 最终为约 1.5 mm × 1.5 mm × 1.5 mm 大小, 继续脱钙, 至针尖可刺破骨皮质时, 终止脱钙。自来水漂洗过夜 24 h, 梯度乙醇慢脱水, 氯仿透明, 浸蜡, 常规石蜡包埋, 垂直于骨缝界面作连续切片, 厚约 4 μm, 每条骨缝各取 5 张连续切片, 常规苏木精-伊红染色作组织学观察测量和原位杂交检测。标本制作的各个步骤应注意避免核糖核酸酶污染, 所用的器皿皆经高温灭活核糖核酸酶, 所用的液体需用 0.1% DEPC 处理后再高温灭菌, 切片机和烤片机用 70% 的乙醇彻底清洗, 用 DEPC 处理过的水清洗展片。

1.5 原位杂交检测骨缝区 TGF- 1 mRNA 的表达

切片烤片过夜, 经脱蜡至 DEPC 水, 滴加新稀释的 10 mg/L 的蛋白酶 K 溶液 37℃ 消化 30 min, 梯度乙醇脱水, 37℃ 烤箱 5 min 干燥切片。杂交前探针 95℃ 水浴变性 5 min, 冰上淬灭。每张滴加 1 滴。70℃ 烤箱 8~10 min, 使 RNA 变性, 切片在 37℃ 湿盒内孵育过夜, 滴加 RNase 酶 (15 mg/L) 湿盒 37℃ 孵育 30 min, 再用蛋白封闭液洗涤 3 min × 3, 加入连接物湿盒 37℃ 孵育 20 min, 切片在去垢剂中浸泡 5 min, 滴加酶底物, 避光显色 40~60 min, 直至镜下观察阳性细胞出现紫蓝色颗粒后, 自来水冲洗终止显色反应。常规脱水透明, 封片。实验中设立未加探针的切片为空白对照, 用 RNA 酶处理的切片为阴性对照。

1.6 图像分析

采用中国北京天地电子科技公司提供的真色彩病理显微图像分析系统软件进行图像分析。各组左右侧每条骨缝分别选取苏木精-伊红染色切片 5 张, 原位杂交切片 3 张, 每张切片在高倍镜下 (×200) 随机选择 3 个视野, 由摄像机采集图像, 呈像于彩色监视器上, 在事先定好的参数背景下, 测量苏木精-伊红染色切片的被测骨缝区中细胞密度, 以反映骨缝区细胞的增殖情况; 测量原位杂交染色切片的 TGF- 1 mRNA 阳性细胞面积, 计算阳性率 (阳性率 = 骨缝区内阳性细胞面积/骨缝区面积 × 100%), 且以 2 次测量值的均值为实测值。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 11.0 统计学软件包对数据进行方差分析比较, 如果组间差异有显著性, 再进行最小显著差法的两两比较检验。

2 结果

2.1 骨缝的细胞密度值

各条骨缝的细胞密度测量结果见表 1, 经方差分析, 水平组的腭颌缝和垂直组的翼上颌缝的细胞密

度,在组间比较上无差异 ($P > 0.05$),其余各组均有明显差异 ($P < 0.01$)。经最小显著差法的两两比较检验分析,水平走行的颧颞缝3月实验组和对照组无差异 ($P > 0.05$),6月实验组细胞密度增加,均高于3月实验组和对照组 ($P < 0.01$);垂直组的额颌缝,3月实验组高于对照组 ($P < 0.01$),6月实验组高于3月实验组 ($P < 0.01$);斜行组的颧颌缝,实验组都高于对照组 ($P < 0.01$),3月实验组高于6月实验组 ($P < 0.05$)。

表1 骨缝的细胞密度测量结果(个/平方微米, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1 The result of cellular density measurement in the sutures (piece/ μm^2 , $\bar{x} \pm s$)

| 部位 | 3月组 | | 6月组 | |
|------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | 实验组 | 对照组 | 实验组 | 对照组 |
| 腭颌缝 | 0.173 \pm 0.020 | 0.200 \pm 0.026 | 0.207 \pm 0.036 | 0.190 \pm 0.017 |
| 颧颞缝 | 0.116 \pm 0.014 | 0.120 \pm 0.017 | 0.149 \pm 0.032 | 0.113 \pm 0.012 |
| 翼上颌缝 | 0.138 \pm 0.017 | 0.128 \pm 0.022 | 0.144 \pm 0.017 | 0.138 \pm 0.030 |
| 额颌缝 | 0.110 \pm 0.018 | 0.074 \pm 0.005 | 0.196 \pm 0.021 | 0.075 \pm 0.012 |
| 颧颌缝 | 0.153 \pm 0.014 | 0.078 \pm 0.014 | 0.139 \pm 0.036 | 0.088 \pm 0.012 |

2.2 骨缝区 TGF-1 mRNA 的表达

骨缝区 TGF-1 mRNA 阳性率结果见表2,经方差分析,各组均有明显差异 ($P < 0.01$)。经最小显著差法的两两比较检验分析,除颧颞缝和翼上颌缝6月实验组和对照组无显著差异外 ($P > 0.05$),其余各实验组和对照组间都有显著差异 ($P < 0.01$),都表现为实验组表达强于对照组,3月实验组表达强于6月实验组。水平组骨缝3月实验组表达约2倍于6月实验组;额颌缝3月实验组表达约3倍于6月实验组;而翼上颌缝的这一比率约为1.7倍;斜行组的颧颌缝3月实验组和6月实验组的表达强度则较为接近。腭颌缝区 TGF-1 mRNA 原位杂交的结果见图1,以胞浆和胞核紫蓝色着色为阳性染色,实验组表达强于对照组,3月实验组表达强于6月实验组。

表2 骨缝区 TGF-1 mRNA 阳性率(%)

Tab 2 The positive rate of the expression of TGF-1 mRNA in the sutures(%)

| 部位 | 3月组 | | 6月组 | |
|------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | 实验组 | 对照组 | 实验组 | 对照组 |
| 腭颌缝 | 5.21 \pm 0.64 | 1.57 \pm 0.37 | 3.08 \pm 0.60 | 1.22 \pm 0.14 |
| 颧颞缝 | 1.77 \pm 0.08 | 0.89 \pm 0.13 | 0.92 \pm 0.10 | 0.99 \pm 0.14 |
| 翼上颌缝 | 3.18 \pm 0.71 | 1.57 \pm 0.31 | 1.82 \pm 0.36 | 1.45 \pm 0.11 |
| 额颌缝 | 6.05 \pm 0.66 | 1.15 \pm 0.19 | 1.93 \pm 0.56 | 1.13 \pm 0.09 |
| 颧颌缝 | 8.22 \pm 0.78 | 1.10 \pm 0.30 | 6.47 \pm 0.31 | 1.00 \pm 0.04 |



上:对照组; 下:6月组

图1 TGF-1 mRNA 在腭颌缝的表达 原位杂交 $\times 200$

Fig 1 The expression of TGF-1 mRNA in palatomaxillary suture in situ hybridization $\times 200$

3 讨论

TGF-1 为一同源双体蛋白,以血小板和骨中含量最为丰富,具有多种生物学效应,是骨代谢的一种重要局部因子,可刺激多种骨组织细胞的增殖分化,刺激骨膜生发层的骨祖母细胞向成骨细胞转化,促进成骨细胞增殖及合成细胞外基质的能力进而促进新骨的形成,并使成熟的成骨细胞聚集²。但也有学者认为³,TGF-1 早期抑制细胞的增殖,然后随着作用时间的延长,抑制作用转变为促进细胞增殖作用。

本研究采用磁力功能矫治器在实验动物上颌骨施加矫形力,通过原位杂交技术观察 TGF-1 mRNA 在上颌骨骨缝区的表达,发现除颧颞缝和翼上颌缝6月实验组和对照组无显著差异外,其余各实验组和对照组间都有显著差异,实验组表达强于对照组,3月实验组表达强于6月实验组。可以推测骨缝区细胞受矫形力作用后生物学行为发生了改变,提示 TGF-1 与组织积极改建有关。Sawada 等⁴发现在快速扩大腭中缝时,受力后测得腭中缝有内源性 TGF-1 的表达,认为 TGF-1 在应力作用部位的骨形成中起重要的作用,可能导致骨的形成。Cillo 等⁵用 Northern 印迹杂交证实,TGF-1 在加力 8、16、24 h 后 mRNA 表

达都增强。刘大为等⁶研究提出,不同牵张强度和频率作用对 TGF-1 mRNA 表达影响的差别具有显著性,低强度-低频率作用的影响最为显著。从本研究结果中可见在矫治第6个月,其矫治力减小时,TGF-1 mRNA 的表达相应减弱,说明实验中使用的矫形力强度在组织能够接受的范围之内,能够刺激组织发生积极改建。6月实验组 TGF-1 mRNA 的表达虽有减弱,但仍高于对照组,提示 TGF-1 不但参与骨缝早期的改建,而且在骨缝内环境重新达到稳定的过程中也发挥了作用,这一时期 TGF-1 可能是对基质合成的调节起作用^{2,7}。

各骨缝区 TGF-1 mRNA 在不同时间表达的强弱与各条骨缝对颌间类矫形力的反应在时间上的差异有关。实验组翼上颌缝的表达较弱,6月实验组与对照组无差异,提示其改建发生和结束都较早,6个月时已接近完成;颞颥缝的表达近似翼上颌缝,推测颞颥缝也参与了早期的反应;而在腭颌缝和额颌缝中,3月实验组明显强于6月实验组,表明它们的改建略晚于翼上颌缝;颞颌缝 TGF-1 mRNA 的持续高水平表达,与其受力情况特殊,组织学改建不规则有关系。

上述骨缝的分子生物学变化与各自的组织学变化相吻合。在矫形治疗的早期,骨缝区的细胞分泌 TGF-1,促使未分化的间充质细胞增殖。在矫形力的作用下,增殖的细胞同样以自分泌和旁分泌的方式产生 TGF-1,造成局部 TGF-1 含量的增加,而高浓度的 TGF-1 对细胞的增殖有抑制的作用⁸,随着时间推移,TGF-1 在局部的浓度下降,在较低浓度的 TGF-1 刺激下反而可能促使细胞增殖的再次加速。正是这种 TGF-1 的双向调节作用和受力状况的差异造成了各条骨缝在细胞密度和 TGF-1 mRNA 表达上的不同。3月实验组颞颥缝、额颌缝的细胞密度低于6月实验组,而两者在第3个月 TGF-1 mRNA 表达却强于第6个月,可能是在第3个月时 TGF-1 的高浓度抑制了细胞的增殖。翼上颌缝和腭颌缝是矫形力早期作用的区域,细胞密度在第3个月略低于第6个月,提示在第3个月这两条骨缝处于受 TGF-1 抑制效应的末期,而第6个月的细胞密度增加幅度小于颞颥缝、额颌缝,其原因可能是这两条骨缝在持续较低强度矫形力作用下是主要的承受者,TGF-1 在局部

的较高浓度维持的时间比颞颥缝、额颌缝要长。颞颌缝在矫治第3个月的细胞密度和 TGF-1 mRNA 表达强度都强于第6个月,也与其受力的状况有关,由于颞颌缝邻接界面面积大,受力方向与界面有一定角度,使得拉开较为困难,出现 TGF-1 高浓度抑制反应的时间可能是在第3个月以后。

笔者推测,在颌间类矫形力作用下翼上颌缝最早完成对矫形力的反应,颞颥缝也参与了早期的反应,腭颌缝和额颌缝的改建略晚于翼上颌缝,颞颌缝的改建最为持久,翼上颌缝和腭颌缝是矫治的主要承受者。这与 Vardimon 等⁹研究有类似之处:翼上颌裂下方骨缝比翼上颌裂上方骨缝更明显可见成骨活动。但由于 Graber 采用的是以垂直分力为主的矫形力系统,他们发现,翼上颌裂骨缝的分裂是从上到下、从侧面到中部的消失,这与本研究采用以矢状分力为主的矫形力系统得到的结论有所不同。

[参考文献]

- 1] 李煌,徐芸,李松,等.颌间类矫形力对青春期恒河猴上颌骨作用的影像学研究J. 华西口腔医学杂志,2003,21(6):463-466.
- 2] 司晓辉,金岩,杨连甲.骨折愈合过程中BMP2和TGF-1的基因表达及分析J. 中华创伤杂志,1997,13(3):143-145.
- 3] 王凡,李爱冬,李瑞祥,等.转化生长因子-1对颌软骨细胞增殖周期的作用J. 华西医科大学学报,1999,30(3):274-276.
- 4] Sawada M, Shimizu N. Stimulation of bone formation in the expanding mid-palatal suture by transforming growth factor-beta 1 in the rat J. Eur J Orthod, 1996,18(2):169-179.
- 5] Cillo JE, Cassner R, Koepsel RR, et al. Growth factor and cytokine gene expression in mechanically strained human osteoblast-like cells: implications for distraction osteogenesisJ. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2000,90(2):147-154.
- 6] 刘大为,傅民魁,李盛琳,等.机械牵张作用对UMR-106细胞骨桥蛋白mRNA和TGF-1 mRNA表达的影响J. 中华口腔医学杂志,2000,35(1):27-30.
- 7] 李煌,徐芸,李松,等.颌间类矫形力作用下转化生长因子-1在髌突软骨中的基因表达J. 华西口腔医学杂志,2004,22(1):73-76.
- 8] 唐康来,杨柳,吴梅英,等.TGF-1对兔颅骨成骨样细胞体外成骨作用J. 中国矫形外科杂志,2000,7(10):986-988.
- 9] Vardimon AD, Graber TM, Stutzmann J, et al. Reaction of the pterygomaxillary fissure and the condylar cartilage to inter-maxillary Class magnetic mechanics J. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 1994,105(4):410-413.

(本文编辑 汤亚玲)

《华西口腔医学杂志》投稿须知

因本刊采用双盲审稿,作者姓名、单位名称(中英文)、邮政编码及通讯作者的E-mail地址均列于另页,正文(含英文摘要)中不列作者姓名和单位。

《华西口腔医学杂志》编辑部