

[文章编号 1000-1182(2004)01-0029-03

功能矫形前伸下颌后大鼠髁突软骨细胞 睾酮的分布变化规律

李小兵, 陈开云, 周 征, 罗颂椒

(四川大学华西口腔医院 正畸科, 四川 成都 610041)

[摘要] 目的 研究快速生长期大鼠髁突软骨细胞睾酮的表达,并探讨功能矫形对髁突软骨细胞睾酮表达的影响。方法 实验组戴自制模拟的功能矫治器引导大鼠下颌前伸,在实验第3天、1、2、3及4周处死大鼠,应用免疫组织化学SP法检测睾酮在髁突软骨细胞上的表达特点。结果 实验组、对照组大鼠髁突软骨细胞各层都有睾酮的阳性免疫染色,大鼠各层细胞中以成熟层及移行层阳性强度较高,明显高于生发层及过渡层,其中成熟层染色强度最高;随着大鼠的青春期生长发育,髁突软骨细胞各层睾酮染色强度出现不同的变化特点;实验第2及第3周组大鼠髁突成熟层软骨细胞睾酮染色强度明显高于对照各组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。结论 睾酮参与了大鼠髁突软骨细胞成熟的调控,并介导了功能矫形的机械刺激作用,使髁突软骨细胞的增生分化功能增强,髁突软骨增生。

[关键词] 睾酮; 功能矫形; 髁突软骨

[中图分类号] R783.5 [文献标识码] A

Expression of Testosterone in the Rapid Growing Rat Condylar Cartilage and the Expression Changes after the Function Mandibular Advancement LI Xiao-bin, CHEN Kai-yun, ZHOU Zheng, LUO Song-jiao. (Dept. of Orthodontics, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expressions of Testosterone in the condylar cartilage of rapid growing rats. **Methods** The mimic functional appliances were used in experiment groups and rats were killed after 3 days, 1week, 2weeks, 3weeks and 4weeks. Immunohistochemical technique was used to detect the expression of T. **Results** T was expressed throughout the condylar cartilage. The Highest expressions were in mature layers of both experiment and control groups. Along with the maturation, the expressions of T in the condylar cartilage were changed respectively, and the immunostain levels in the mature layer of experiment groups 2 and 3 weeks were higher than those of control groups ($P < 0.05$). **Conclusion** T is a member of cartilage growth and development control system. The orthopedic mechanism of functional appliance may be conducted by T.

[Key words] testosterone; functional orthopedics; condylar cartilage

近年来对性激素的研究发现,雌激素和雄激素是骨代谢的重要调节因子:体内缺乏性激素会引发骨质疏松症。体外研究证明生理剂量的雌激素可刺激软骨的细胞增生和基质合成¹;而睾酮能增加骨小梁及骨皮质的密度²,并通过IGF-1的介导刺激髁突软骨的增生³。体内研究⁴发现雌激素参与了生长发育期雌性大鼠髁突软骨细胞的调控。但对于生长期大鼠髁突软骨中有无雄激素的分布及其在髁突增生分化调控中的作用,目前的研究较少。本研究采用具有代表性的雄激素——睾酮(testosterone)进行研究,用免疫组织化学法检测其在生长发育期大鼠髁突软骨细胞的表达情况,以期了解睾酮对髁

突软骨分化成熟的作用;并对功能矫形前伸下颌后大鼠髁突软骨上睾酮的含量进行半定量分析,以初步探讨睾酮在功能矫形中的作用,为完善功能矫形的分子生物学理论提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

兔抗睾酮(T)多克隆抗体、生物素化羊抗兔IgG和SP试剂盒(Santa Cruz,美国);自制上颌斜面导板式功能矫治器³;Mias 2000图像分析软件系统(四川大学图形图像研究所)。

1.2 实验方法

采用50只5周龄处于快速生长初期的SD雄性大鼠,体重90g左右,随机等量地分为对照组和实验组,其中实验组大鼠白天戴自制上颌斜面导板式功能矫治器12h以前伸下颌,对照组不戴。实验共4

[收稿日期 2003-03-04; 修回日期 2003-06-10

[基金项目]国家自然科学基金资助项目(39470760)

[作者简介]李小兵(1966-),男,四川人,副教授,博士

[通讯作者]李小兵, Tel: 028-85501425

周,直至大鼠快速生长期结束。全部动物自由饮水,定时、定量摄食。分别在实验第 3 天、1、2、3、4 周处死大鼠各 5 只。取下颌髁突,固定、脱钙、石蜡包埋、切片,进行免疫组化染色。

1.3 免疫组织化学 SP 法染色

按 SP 试剂盒说明书步骤进行免疫组化染色,阳性对照:大鼠胫骨近端软骨。阴性对照:用封闭血清(10%羊血清)代替一抗。将睾酮免疫组化染色强度分为四级:

阴性:髁突软骨细胞内无棕色阳性染色;

级:部分髁突软骨细胞胞浆内有少量的浅棕色粉尘状颗粒;

级:部分髁突软骨细胞浆胞内有较多的棕色颗粒;

级:多数髁突软骨细胞胞浆及核内有密集的团块状深棕色颗粒。

1.4 睾酮免疫组化染色强度差异分析

用 Mias 2000 图像分析软件系统测定各组髁突睾酮染色强度半定量数值,结果用 Stata 4.0 软件单因素方差分析进行处理。

2 结果

对照组大鼠髁突软骨细胞各层都有睾酮的阳性表达(图 1,表 1),染色强度弱的细胞阳性表达集中在胞浆中,染色强的细胞,其阳性表达不仅定位在胞浆中也定位在胞核中。大鼠各层细胞中以成熟层及移行层阳性强度较高,明显高于生发层及过渡层,其中成熟层染色强度最高。随着大鼠的生长发育,髁突软骨细胞各层睾酮染色强度出现不同的变化特点。生发层及过渡层细胞在实验第 3 天时无睾酮染色,实验第 1、2、3 周时睾酮的表达增强,在实验第 4 周时又无睾酮的表达。成熟层细胞同样在实验第 3 天时无睾酮表达,但从实验第 2 周开始,睾酮的表达增强,强度超过髁突其余各层,并且较强的睾酮表达持续至实验结束。而移行层睾酮从实验最开始就有表达,表达持续整个实验过程,睾酮表达强度的变化不大。

实验各组大鼠髁突软骨细胞睾酮的表达规律与对照组相似,但染色强度均高于对照各组(图 2),在成熟层第 2 及第 3 周组,其差异具有统计学意义($P < 0.05$)(表 2)。用已知睾酮免疫阳性的大鼠胫骨软骨作阳性对照,结果胫骨中有睾酮的表达,而在阴性对照中为阴性。

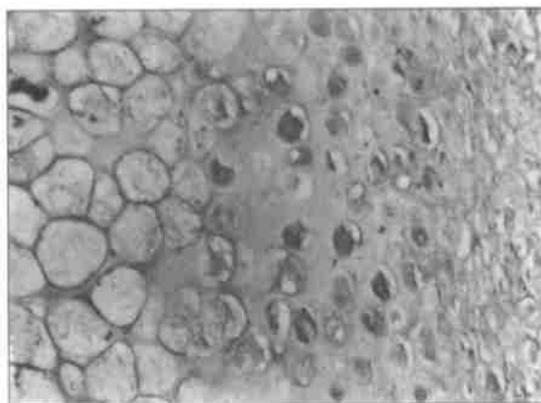


图 1 实验第 2 周,对照组大鼠髁突软骨细胞各层都有睾酮的阳性表达,其中成熟层染色强度最高 SP $\times 400$

Fig 1 Week 2, testosterone expressed throughout the condylar cartilage and the most intense showed in the mature layer SP $\times 400$

表 1 对照组大鼠髁突各层软骨细胞中睾酮的表达

Tab 1 Testosterone is expressed in control group

实验分组	生发层/过渡层	成熟层	移行层
第 3 天	阴性	阴性	
第 1 周			~
第 2 周	~		
第 3 周	~		
第 4 周	阴性		

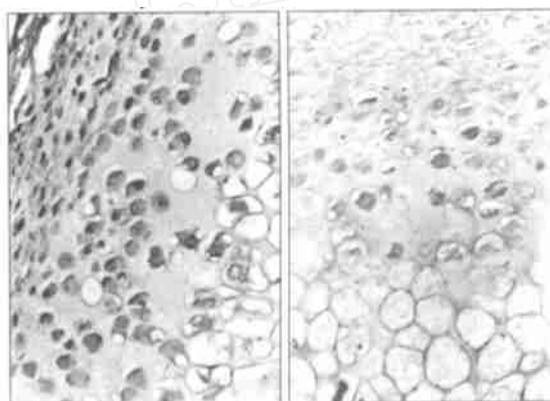


图 2 实验组(左)大鼠髁突各层软骨细胞睾酮的阳性表达高于对照组(右) SP $\times 400$

Fig 2 Testosterone expressed in experimental groups is higher than in control groups SP $\times 400$

表 2 实验组与对照组大鼠髁突各层软骨细胞睾酮免疫组化染色平均黑度值

Tab 2 The averages of gray ludexes of testosterone are expressed both in experimental and control groups

实验分组	实验组			对照组		
	生发层/过渡层	成熟层	移行层	生发层/过渡层	成熟层	移行层
第 3 天	阴性	阴性	66.99	阴性	阴性	64.32
第 1 周	55.37	70.36	68.00	53.0	65.94	64.88
第 2 周	57.48	71.76*	68.10	55.0	66.44*	64.76
第 3 周	57.76	70.82*	66.64	55.0	64.93*	64.43
第 4 周	阴性	65.43	64.76	阴性	64.92	64.12

注:平均黑度值 = 225 - 平均灰度值,平均黑度值越高,免疫染色强度越强; * $P < 0.05$

3 讨论

3.1 髌突软骨细胞睾酮的分布

近年来大量的研究证实:雄激素有助于骨的发育及骨量的维持;骨细胞上有雄激素的受体,说明骨组织细胞是雄激素的靶组织细胞;雄激素也可直接作用于处于不同分化阶段的成骨细胞。睾酮是由辜丸 Leydig 细胞分泌的、循环全身并主要起作用的雄性激素,它与人体绝大多数的组织系统的生长代谢有关,如:生殖系统、中枢神经系统、造血系统、免疫系统及脂肪组织、肌肉组织、骨组织等。检测睾酮在青春生长期大鼠髌突软骨细胞上的表达,能初步了解雄激素与髌突软骨生长发育的关系。本实验首次证实了大鼠髌突软骨细胞各层有睾酮分布,在成熟层及移行层中,分化的成软骨细胞和软骨细胞的染色明显高于生发层及过渡层细胞中低分化的软骨祖细胞和前成软骨细胞。其表达具有特异性,说明睾酮参与了髌突软骨生长发育的调控。

3.2 生长发育期髌突的发育与性激素的关系

青春期是由性激素、生长激素以及通过自、旁分泌的局部生长因子等的协同,共同作用在骨生长板上而发生的⁵。以前的研究发现:在雌性 SD 大鼠髌突上可检测到雌激素及其受体^{3,5},并证实髌突软骨的生长发育特别是髌突的增生与雌激素有关。本研究发现:雄性大鼠髌突软骨睾酮的染色主要以成熟的软骨细胞为主,其染色强度从生长高峰期开始时(即实验开始时第5周龄大鼠)就高,并在整个生长高峰期持续较强表达,至实验结束。而低分化的软骨祖细胞、前成软骨细胞染色明显较成熟的软骨细胞弱,在生长高峰期开始时几乎无表达,进入高峰期后表达达到最高,在高峰末期又迅速降低,这说明睾酮对髌突软骨细胞的增生及分化都有作用,但其对分化的作用较对增生的作用更明显。Maor 等^{6,7}在研究中发现:睾酮能明显刺激体外培养的大鼠髌突软骨的体积增加、DNA 合成增加;过量的睾酮还能使髌突软骨骨化,说明睾酮能刺激软骨的增生及分化,并明显促进软骨的成熟,本研究结果与其研究一致。

3.3 功能矫形对睾酮在各层髌突软骨细胞上表达的影响

本研究发现,睾酮在各层髌突软骨上的表达与生长发育的程度有关,在低分化的软骨祖细胞、前成软骨细胞与成熟的软骨细胞,随生长发育而呈现明显不同,表明了睾酮对软骨内成骨作用的特点,即在青春生长的高峰期,睾酮对软骨细胞的增生及分化均有作用,但在青春快速生长的后期,睾酮主要参与细胞分化的调控而对增生的作用减小。

功能矫形后,大鼠髌突软骨上睾酮的表达表现出与对照组相似的分布特点,但在实验第2、3周组大鼠髌突成熟层软骨细胞的睾酮的表达与对照组有显著性差异($P < 0.05$)。这说明功能矫形前伸大鼠下颌的作用刺激了睾酮的表达,从而促进了髌突软骨细胞的增生分化,说明睾酮在功能矫形前伸大鼠下颌后髌突软骨的适应性生长改建过程中介导机械力刺激的生物效应。但睾酮如何介导功能矫形力的作用,以及睾酮与其他激素和局部生长因子在髌突生长发育中的相互关系,有待进一步的研究。

[参考文献]

- 1] Corvol MT, Carrsco A, Tsagris L. Evidence for a direct in vitro action of sex steroids on rabbit cartilage cells during skeletal growth: Influence of age and sex J. *Endocrinology*, 1987, 120(3):1422.
- 2] Mboradian AD, Morley JE, Korenman SG. Biological Actions of Androgens J. *Endocr Rev*, 1987, 8(1):1-27.
- 3] 白玉兴, 罗颂椒. 大鼠下颌功能前伸后髌突软骨雌激素含量变化的研究 J. *中华口腔医学杂志*, 1997, 32(3):161-163.
- 4] Caufriez A. The pubertal spurt: effects of sex steroids on growth hormone and insulin-like growth factor J. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 1999, 71(5):215-217.
- 5] 白玉兴, 罗颂椒. 功能矫治前伸下颌后大鼠髌突软骨雌激素受体变化规律的研究 J. *中华口腔医学杂志*, 1998, 33(6):372-374.
- 6] Maor G, Segev Y, Philip M. Testosterone stimulates insulin-like growth factor- and insulin-like growth factor- receptor gene expression in the mandibular condyle — a model of endochondral ossification J. *Endocrinology*, 1999, 140(4):1901-1910.
- 7] Philip M, Palese T, Hernandez ER. Effect of testosterone on insulin-like growth factor- and IGF- receptor gene expression in the hypophysectomized rat J. *Endocrinology*, 1992, 130(6):2865-2870.

(本文编辑 汤亚玲)

《华西口腔医学杂志》被 MEDLINE 数据库收录

MEDLINE 数据库是美国国立医学图书馆 MEDLARS 系统中规模最大、权威性最高的著名医学文献数据库。内容涉及医学、护理学、牙科学、兽医学、卫生保健和基础医学,收录了全世界 70 多个国家和地区的 4000 余种生物医学期刊。《华西口腔医学杂志》是目前被 MEDLINE 数据库收录的少数中文口腔医学专业期刊之一。