

## SD 大鼠髁状突颈部骨折对大鼠髁状突软骨细胞增殖与凋亡的影响

夏英杰<sup>1)</sup>, 陈建中<sup>2)</sup>

(1) 景洪市人民医院口腔科, 云南 景洪 666100; 2) 昆明医科大学口腔医学院, 云南 昆明 650031)

**[摘要]** **目的** 研究发育期 SD 大鼠髁状突颈部骨折对下颌髁状突软骨细胞增殖和凋亡活性的影响. **方法** 18 只 4 周龄 SD 大鼠, 分为髁状突骨折组及空白对照组, 分别于术后 1 周、3 周、5 周时脱颈处死, 取骨折组手术侧、非手术侧及空白对照组髁状突软骨, 分别采用免疫组织化学染色和 TUNEL 染色, 观察髁状突软骨细胞中增殖细胞核抗原 (PCNA) 阳性细胞数和凋亡细胞数. **结果** 在各时间点, 手术侧、非手术侧的 PCNA 阳性细胞数存在统计学差异 ( $P < 0.01$ ). 术后 3、5 周, 空白组与手术侧 PCNA 阳性细胞数有统计学差异 ( $P < 0.01$ ); 术后 3 周, 非手术侧大鼠髁状突软骨中凋亡细胞数明显增多, 手术侧凋亡细胞数随时间推移明显降低; 术后 1 周, 手术侧的凋亡细胞数明显多于非手术侧 ( $P < 0.01$ ); 术后 3 周, 非手术侧的凋亡细胞数明显多于手术侧 ( $P < 0.01$ ); 术后 1、5 周, 空白组与手术侧凋亡细胞数有显著性差异 ( $P < 0.01$ ). **结论** 一侧髁状突颈部骨折导致两侧髁状突所受应力失衡, 影响两侧髁状突软骨细胞增殖与凋亡的平衡, 进而影响下颌骨及颌面部的发育.

**[关键词]** 骨折; 髁状突软骨; 增殖; 凋亡

**[中图分类号]** R782.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2012) 05 - 0033 - 05

## Effect of Unilateral Condylar Neck Fracture on the Proliferation and Apoptosis of Condylar Cartilage Cells in SD Rats

XIA Ying - jie<sup>1)</sup>, CHEN Jian - zhong<sup>2)</sup>

(1) Dept. of Stomatology, Jinghong People's Hospital, Jinghong Yunnan 666100; 2) School of Stomatology, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650031, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of unilateral condylar neck fracture on the proliferation and apoptosis of condylar cartilage cells in SD rats. **Methods** Eighteen 4 weeks old rats were randomly divided into two groups: experimental group (unilateral condylar neck fracture), and control group (no operation). The rats were killed at 1, 3, 5 weeks after surgery, condylar cartilages were obtained in the operating side, non-operating side of rats in experimental group and control group. Immunohistochemical staining was used to qualitatively examine the PCNA positive cell, TUNEL was chosen to detect the apoptotic cell. **Results** There was significant difference in PCNA positive cell number between operating side and non-operating side in experimental group at different time ( $P < 0.01$ ). There was significant difference in PCNA positive cell number between operating side and non-operating side in control group at 3 and 5 weeks after surgery. There was significant difference in apoptotic cell number between operating side and non-operating side at 1 and 3 weeks after surgery. There was significant difference in apoptotic cell number between operating side and non-operating side in control group at 1 and 5 weeks after surgery. **Conclusion** The unbalanced stress caused by unilateral condylar neck fracture breaks the balance of cell proliferation and apoptosis, and affects the development of mandible and oralsurface.

**[Key words]** Fracture; Condylar cartilage; Proliferation; Apoptosis

**[基金项目]** 云南省教育厅科学研究基金资助项目 (2011Y198)

**[作者简介]** 夏英杰 (1977~), 男, 云南景洪市人, 医学学士, 主治医师, 主要从事口腔临床工作.

**[通讯作者]** 陈建中. E-mail: cjz1128@hotmail.com

下颌髁状突软骨与四肢生长板软骨生长方式同为软骨内成骨,而目前认为,四肢生长板软骨主要受遗传因素影响,而髁状突发育主要受到局部应力及相关生长因子的影响,其中应力的作用尤为重要<sup>[1-4]</sup>。国内外对应力作用下髁状突软骨细胞功能改变和分子信号的转导做了大量研究,结果显示:应力可影响髁状突软骨细胞的增殖、分化和基质形成,对髁状突的早期发育起着重要作用<sup>[4-7]</sup>,但这些研究多数是通过软骨细胞体外培养进行研究,但体外培养环境和体内情况不同,不能直观研究。故本实验通过建立4周龄SD大鼠下颌髁状突颈部骨折动物模型来研究体内髁状突应力改变对髁状突生长发育的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

选择4周龄雄性SD大鼠18只(昆明医科大学动物试验中心),要求体重相近。

### 1.2 分组与手术方法

**1.2.1 随机分组** 分为3组:第1组:髁状突手术侧(右侧),第2组:髁状突非手术侧(右侧),第3组:空白对照组。

**1.2.2 手术方法** 取左侧卧位固定大鼠,常规消毒,右耳前1cm纵切口,切开皮肤、皮下组织。拉开腮腺,从颞肌、咬肌及外耳道之间的凹陷处入手。钝剥离暴露髁突颈部,用眼科剪于关节囊外,乙状切迹水平髁突颈部剪断髁突颈。最后,分层缝合创口。

**1.2.3 切片制作** 在术后1、3、5周时分别处死大鼠,取出骨折组手术侧(右侧)、非手术侧(左侧)、空白对照组(右侧)的髁状突软骨,多聚甲醛溶液固定,10%EDTA溶液脱钙2周。梯度乙醇脱水,石蜡包埋,行4 $\mu$ m厚的连续矢状切片。

**1.2.4 增殖细胞核抗原( proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 免疫组织化学染色检测增殖细胞** 石蜡切片常规脱蜡至水;枸橼酸盐缓冲液微波炉抗原修复;3%过氧化氢处理,以消除内源性过氧化物酶活性;非免疫性动物血清孵育10min,甩去;滴加一抗(PCNA抗体,工作浓度1:100),4 $^{\circ}$ C过夜,PBS冲洗3 $\times$ 3min/次;滴加生物素化山羊抗小鼠IgG,37 $^{\circ}$ C,10min,PBS冲洗3 $\times$ 3min/次;滴加SABC复合液,37 $^{\circ}$ C,10min,PBS冲洗3 $\times$ 3min/次;滴加DAB显色液,显微镜下观察呈色,呈色约1min,见到明显棕黄色颗粒为止;蒸馏水漂洗,梯度酒精脱水,二甲苯透

明,中性树胶封片。对照组:采用空白对照,以PBS代替一抗,其余程序与正常染色相同。

**1.2.5 原位末端标记法(TUNEL法)检测凋亡细胞** 检测凋亡细胞切片脱蜡至水;蛋白酶K孵育37 $^{\circ}$ C,15min;PBS洗2 $\times$ 3min/次;TUNEL反应液孵育,50 $\mu$ L/片,37 $^{\circ}$ C,60min;PBS洗3 $\times$ 3min/次;辣根过氧化酶孵育,50 $\mu$ L/片,37 $^{\circ}$ C,30min,PBS洗3 $\times$ 3min/次,DAB显色剂室温孵育5~10min,PBS洗3 $\times$ 3min/次,苏木素复染,酒精脱水,干燥,中性树胶封片。对照组:采用空白对照,以TUNEL染色试剂盒中的标记液代替反应液,其余程序与正常染色相同。

### 1.3 结果判定

光学显微镜下,PCNA免疫组化染色阳性细胞的棕黄色阳性反应颗粒位于细胞核内,着色水平明显高于背景色的平均水平。各样本在40 $\times$ 10高倍镜下,在髁状突软骨的增殖层和肥大层,连续计数3个视野中的PCNA阳性细胞数,取均值。

光学显微镜下,TUNEL染色阳性细胞的细胞核呈蓝黑色。各样本于40 $\times$ 10高倍镜下,在髁状突软骨的肥大层和软骨成骨层,连续计数3个视野中的阳性细胞数,取均值。

### 1.4 统计学方法

应用SPSS统计分析软件对实验数据进行双因素方差分析,两两比较采用LSD法。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 PCNA 阳性细胞表达

PCNA阳性细胞集中分布于髁状突软骨的增殖层和浅肥大层,在纤维层和软骨钙化层也有少量表达。手术侧及非手术侧术后3周均较术后1、5周高,空白组呈现递减的趋势。术后1、3、5周手术侧及非手术侧PCNA阳性细胞数有显著性差异( $P < 0.01$ )。空白组在术后3、5周与手术侧有显著性差异( $P < 0.01$ )。术后3周,手术侧与非手术侧均与术后1周有显著性差异( $P < 0.01$ ),见表1,图1~4。

### 2.2 TUNEL 阳性细胞表达

TUNEL阳性细胞胞核主要见于成软骨细胞层、肥大层。手术侧、非手术侧及空白组均有下降趋势,但手术侧下降趋势明显。术后1周,非手术侧、空白组与手术侧有统计学意义( $P < 0.01$ )。术后5周,空白组与手术侧有统计学意义( $P < 0.01$ )。术后3周,手术侧、非手术侧及空白对照组均与术后1周有统计学意义( $P < 0.01$ ),见图5~8,表2。

表 1 大鼠髌状突软骨中 PCNA 阳性细胞数 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 1 The number of PCNA positive cells in condylar cartilage of rats ( $\bar{x} \pm s$ )

组 别	术后 1 周	术后 3 周	术后 5 周
手术侧 (右) 组	12.33 ± 1.155	17.00 ± 1.000 <sup>△△</sup>	14.67 ± 1.155
非手术侧 (左) 组	5.67 ± 0.577 <sup>**</sup>	10.67 ± 2.082 <sup>**△△</sup>	2.67 ± 1.155 <sup>**△△</sup>
空白对照组	11.33 ± 4.163	9.33 ± 2.082 <sup>**</sup>	4.33 ± 0.577 <sup>**△△</sup>

与同一时间点骨折侧比较, <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ ; 与同一组前一时间点比较, <sup>△△</sup> $P < 0.01$ .



图 1 术后 3 周手术侧 PCNA (20 × 10)

Fig. 1 PCNA positive cells in the operating side at 3 weeks after operation (20 × 10)

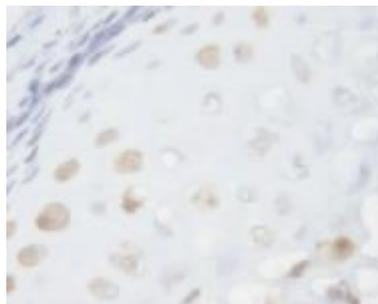


图 4 术后 3 周空白对照组 PCNA (40 × 10)

Fig. 4 PCNA positive cells in the non-operating side at 3 weeks after operation (40 × 10)



图 2 术后 3 周手术侧 PCNA (40 × 10)

Fig. 2 PCNA positive cells in the operating side at 3 weeks after operation (40 × 10)



图 5 术后 1 周手术侧 TUNEL 阳性细胞 (20 × 10)

Fig. 5 TUNEL positive cells in the operating side at 1 week after operation (20 × 10)



图 3 术后 3 周非手术侧 PCNA (40 × 10)

Fig. 3 PCNA positive cells in the non-operating side at 3 weeks after operation (40 × 10)

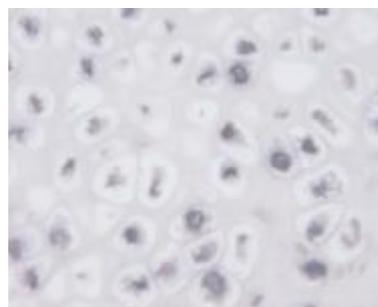


图 6 术后 1 周手术侧 TUNEL 阳性细胞 (40 × 10)

Fig. 6 TUNEL positive cells in the operating side at 1 week after operation (40 × 10)

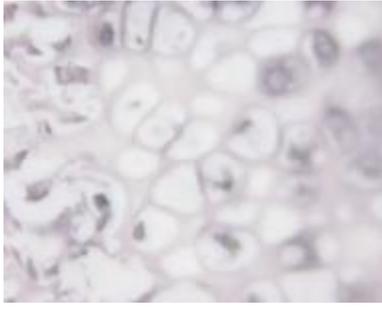


图 7 术后 1 周非手术侧 TUNEL 阳性细胞 (40×10)

Fig. 7 TUNEL positive cells in the non-operating side at 1 week after operation (40×10)

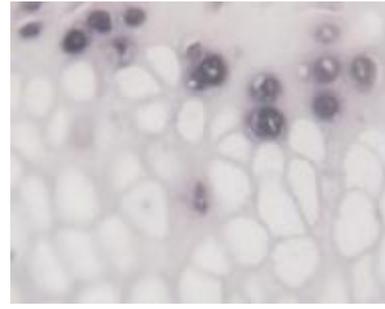


图 8 术后 1 周空白对照组 TUNEL 阳性细胞 (40×10)

Fig. 8 TUNEL positive cells in the non-operating side at 1 week after operation (40×10)

表 2 大鼠髁突软骨中凋亡细胞数 ( $\bar{x} \pm s$ )Tab. 2 The number of PCNA positive cells in condylar cartilage of rats ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	术后 1 周	术后 3 周	术后 5 周
手术侧 (右) 组	15.67 ± 5.508	3.00 ± 1.000 <sup>△△</sup>	3.33 ± 0.577
非手术侧 (左) 组	3.33 ± 0.577**	12.00 ± 2.000** <sup>△△</sup>	1.67 ± 0.577
空白对照组	9.33 ± 0.577**	1.67 ± 0.577 <sup>△△</sup>	0.67 ± 0.577**

与同一时间点骨折侧比较, \*\* $P < 0.01$ ; 与同一组前一时间点比较, <sup>△△</sup> $P < 0.01$ .

### 3 讨论

在髁状突软骨中, 软骨细胞的数量和功能对于关节软骨的正常发育和生理功能都具有十分重要的意义. 髁状突软骨细胞的总数量受软骨细胞增殖和凋亡数量的影响, 进而影响软骨内成骨及髁状突发育<sup>[8,9]</sup>. 髁状突软骨细胞增殖与凋亡在颞下颌关节的发育过程中起着重要的作用, 维持二者的动态平衡是保证其正常发育的条件, 在髁状突软骨发育过程中, 应力变化对髁状突软骨细胞增殖与凋亡是否产生影响尚待深入研究.

国内外对髁状突软骨细胞增殖与凋亡的表达研究主要分为体内动物模型和体外细胞及器官培养两方面. Hajjar<sup>[10]</sup>等发现给大鼠戴功能性矫治器可促进髁状突软骨细胞增生, PCNA 的表达强度增加, 但 Teramoto M<sup>[11]</sup>等给大鼠带矫治器对髁状突实施持续性的压力发现软骨细胞增殖及基质合成减少. Pirttiniemi P<sup>[12]</sup>通过给大鼠喂食软硬食及磨短前牙发现软食组及限制切牙活动将使髁状突软骨细胞增殖活性和基质蛋白合成明显降低. Yamamoto<sup>[13]</sup>等对体外培养的髁状突软骨细胞施加 50 g/cm<sup>2</sup> 静压力 20 h 后发现细胞增殖、分泌活性下降. Jiao K<sup>[14]</sup>等通过建立大鼠实验性错颌, 发现错颌可引起髁状突软骨的退变及凋亡细胞的增多. Kim J Y<sup>[15]</sup>通过对大鼠咬肌注射肉毒素 A 发现注射侧髁状突软骨增殖层细胞凋亡增加影响髁状突软骨发育进而抑制下颌骨

发育. 李松<sup>[16]</sup>等通过对第 3 代新生 SD 大鼠髁状突软骨细胞加力, 发现细胞增殖指数在 36 kPa 加力结束时减幅最大, 细胞凋亡指数则在 12 kPa 加力结束时减幅最大, 软骨细胞增殖、凋亡与应力值存在一定的关系. 以上体内外实验均提示应力变化可影响髁状突软骨细胞成熟分化及基质的合成, 且应力过强或过低都可能会引起髁状突的病理性变化.

颞下颌关节是左右联动关节, 而髁状突是下颌骨的生长区, 通过影响下颌骨的生长量和生长方向, 进而进一步影响颌面部的生长发育. 本实验通过建立 SD 大鼠髁状突颈部骨折动物模型, 研究骨折组手术侧、非手术侧及空白对照组软骨细胞增殖与凋亡情况. 结果显示在各时间点, 手术侧、非手术侧的 PCNA 阳性细胞数存在统计学差异 ( $P < 0.01$ ). 术后 1、5 周手术侧 PCNA 阳性细胞数明显多于非手术侧. 术后 3、5 周, 空白组与手术侧 PCNA 阳性细胞数有统计学差异. 术后 3 周, 非手术侧大鼠髁状突软骨中凋亡细胞数明显增多, 手术侧凋亡细胞数随时间推移明显降低. 术后 1 周, 手术侧的凋亡细胞数明显多于非手术侧 ( $P < 0.01$ ), 术后 3 周, 非手术侧的凋亡细胞数明显多于手术侧 ( $P < 0.01$ ). 术后 1、5 周, 空白组与手术侧凋亡细胞数有显著性差异. 空白组随时间增加, 细胞增殖与凋亡数量都在减少. 提示一侧髁状突颈部骨折导致的两侧髁状突所受应力失衡打破了两侧髁状突软骨细胞增殖与凋亡的平衡, 而软骨细胞的数目会影

响到髁状突的形态,进而影响下颌骨及颌面部的发育.

### [参考文献]

- [1] MALI K, NISHIOKA T, SHIOIRI E, et al. Effects of dietary consistency on the mandible of rats at the growth stage: computed X-ray densitometric, and cephalometric analysis [J]. *Angle Orthod*, 2002, 72(5):468.
- [2] HABIB H, HATTA T, UDAGAWA J, et al. Fetal jaw movement affects condylar cartilage development [J]. *J Dent Res*, 2005, 84(5):474.
- [3] POIKELA A, KANTOMAA T, PIRTINIEMI P, et al. Unilateral masticatory function changes the proteoglycan content of mandibular condylar cartilage in rabbit Cells [J]. *Tissues Organs*, 2000, 167(1):49.
- [4] 李煌, 李松, 吴拓江, 等. 体外周期性单轴压应力作用下大鼠髁状突软骨细胞肌动蛋白和中间丝波形蛋白的早期变化研究 [J]. *华西口腔医学杂志*, 2007, 25(5): 422 - 425.
- [5] 郭维华, 李松, 徐芸, 等. 应力作用对颞下颌关节髁状突软骨的影响 [J]. *国际口腔医学杂志*, 2007, 34(1): 22 - 23
- [6] 李煌, 徐芸, 李松. 应力作用于髁状突软骨细胞信号传导的可能机制 [J]. *现代口腔医学杂志*, 2006, 20(6): 655 - 657.
- [7] 高国杰, 李松, 徐芸. 压力对髁状突软骨细胞增殖及 TGF- $\beta$  1 mRNA 表达影响的体外研究 [J]. *华西口腔医学杂志*, 2005, 23: 86 - 89.
- [8] KAJIKAWA A, HIRABAYASHI S, HARI K. An experimental study on the growth of condylar cartilage, using a new vascularized mandible heterotopic transplant model [J]. *J Oral Maxillofac Surg*, 2003, 61(2):239 - 245.
- [9] LUDER H U, LEBLOND C P, VON DER MARK K. Cellular stages in cartilage formation as revealed by morphometry, radioautography and type II collagen immunostaining of the mandibular condyle from weanling rats [J]. *Am J Anat*, 1988, 182(3):197 - 214.
- [10] HAJJAR D, SANTOS M F, KIMURA E T. Propulsive appliance stimulates the synthesis of insulin-like growth factors I and II in the mandibular condylar cartilage of young rats [J]. *Arch Oral Biol*, 2003, 48(9):635 - 642.
- [11] TERAMOTO M, KANEKO S, SHIBATA S, et al. Effect of compressive forces on extracellular matrix in rat mandibular condylar cartilage [J]. *J Bone Miner Metab*, 2003, 21(5): 276 - 286.
- [12] PIRTINIEMI P, KANTOMAA T, SORSA T. Effect of decreased loading on the metabolic activity of the mandibular condylar cartilage in the rat [J]. *Eur J Orthod*, 2004, 26(1):1 - 5.
- [13] YAMAMOTO T T, NAKNGAWA K, KAWAHMI M, et al. Comparison of the effect of hydrostatic compressive force on glycosaminoglycan synthesis and proliferation rabbit chondrocytes from mandibular cartilage, nasal septum, and sphenoid-occipital synchondrosis in vitro [J]. *Am J Orthod Dentofac Orthop*, 1991, 99(5):448 - 455.
- [14] JIAO K, WANG M Q, NIU L N, et al. Death and proliferation of chondrocytes in the degraded mandibular condylar cartilage of rats induced by experimentally created disordered occlusion [J]. *Apoptosis*, 2009, 14(1):22 - 30.
- [15] KIM J Y, KIM S T, CHO S W, et al. Growth effects of botulinum toxin type A injected into masseter muscle on a developing rat mandible [J]. *Oral Dis*, 2008, 14(7): 626 - 632
- [16] 李松, 郭维华, 徐芸. 不同静压力对新生SD大鼠髁状突软骨细胞增殖与凋亡的影响 [J]. *实用口腔医学杂志*, 2007, 23(6):822 - 824.

(2012-03-03 收稿)