

## 不对称咀嚼力作用下 CTGF 在髁突软骨中的表达

李玲玲<sup>1,2)</sup>, 倪滔<sup>1)</sup>, 李松<sup>1)</sup>, 罗应伟<sup>1)</sup>

(1) 昆明医科大学口腔医学院, 云南昆明 650031; 2) 天津市第四中心医院口腔科, 河北天津 300140)

**[摘要]** **目的** 探讨不对称咀嚼肌力对 SD 大鼠髁突软骨改建的影响. **方法** 通过手术切除一侧颞肌和肉毒神经毒素 A 注射一侧咬肌, 建立不对称咀嚼肌力 SD 大鼠动物模型, 每组 6 只, 分别于建模后 3、6、9 周处死动物, 免疫组织化学检测 CTGF 在大鼠髁突软骨中的表达. **结果** CTGF 在髁突软骨增殖层、成软骨细胞层和肥大层表达; 实验组 CTGF 的表达均较空白对照组增强 ( $P < 0.05$ ); 实验组双侧髁突 CTGF 表达无明显差异 ( $P > 0.05$ ); 实验组术后 6 周 CTGF 表达强于术后 3 周, 术后 9 周强于术后 6 周 ( $P < 0.05$ ). **结论** 不对称咀嚼肌力可上调髁突软骨细胞 CTGF mRNA 的表达, CTGF 介导了应力对髁突软骨的改建.

**[关键词]** 咀嚼肌力; CTGF; 髁突软骨; 改建

**[中图分类号]** Q954.62 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X (2013) 10 - 0022 - 05

## The Expression of CTGF in Condyle Cartilage under Asymmetric Masticatory Force

LI Ling - ling<sup>1,2)</sup>, NI Tao<sup>1)</sup>, LI Song<sup>1)</sup>, LUO Ying - wei<sup>1)</sup>

(1) School of Stomatology, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650031; 2) Dept. of Stomatology, Tianjin 4th Centre Hospital, Tianjin Hebei 300140, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of the asymmetric of masticatory force on the remodeling of bilateral mandibular condylar cartilage of SD rats. **Methods** The animal models were established respectively by excising the unilateral temporalis, and injecting botulinum toxin A into the unilateral masseter. Dividing three batch processing 3 weeks, 6 weeks, and 9 weeks after the animal modeling, six rats were killed in each group. The expression of CTGF in condylar cartilage was observed by immunohistochemical staining. **Results** CTGF expressed in proliferative layer, chondroblast layer and hypertrophic layer of the condylar cartilage. The expression of CTGF in the experimental groups was increased than control groups ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference between the left and right side in the experimental groups ( $P > 0.05$ ), the expression of CTGF after 6 weeks of operation was stronger than the group after 3 weeks of operation, the expression of CTGF after 9 weeks of operation was the strongest than all of other groups ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** The asymmetric of masticatory force can up-regulate the expression of CTGF mRNA in rat mandibular condylar chondrocytes. CTGF induces the effect of stress-mediated on the mandibular condylar cartilage remodeling.

**[Key words]** Masticatory force; CTGF; Condylar cartilage; Remodeling

颞下颌关节 (temporomandibular joint, TMJ) 作为人体的特殊关节, 左右联动, 与咀嚼肌、血管神经等构成了一个完整的口颌系统, 左右对称的咀嚼肌形成均衡的应力作用于颞下颌关节. 适

当的应力作用有利于颞下颌关节的正常发育, 以及形态和功能的保持, 而异常的应力则可导致颞下颌关节生长、发育畸形, 甚至导致颞下颌关节的退行性疾病的发生. 而结缔组织生长因子 (connective

**[基金项目]** 云南省应用基础研究基金资助项目 (2010ZC116)

**[作者简介]** 李玲玲 (1983~), 女, 山西长治市人, 医学硕士, 住院医师, 主要从事颞下颌关节科研及临床工作.

**[通讯作者]** 罗应伟. E-mail: ywydy@ sina.com

tissue growth factor, CTGF) 是一种可刺激成纤维细胞增殖和胶原沉积生长因子, 可由成纤维细胞、平滑肌细胞和内皮细胞合成分泌. CTGF 广泛表达于人类多种组织器官中, 在病理情况下, 其过度表达与颞下颌关节的某些增生性或纤维化疾病发生发展密切相关.

双侧咀嚼肌动力失衡将直接影响 TMJ 及下颌骨应力的分布, 使其应力异常增大或分布不平衡. 以往的研究主要集中在可见因素及体外实验应力变化对髁突软骨细胞改建影响的方面. 本研究通过建立 SD 大鼠颞肌和咬肌功能失衡动物模型, 检测 CTGF 表达的时空变化, 探讨咀嚼肌力对髁突软骨改进的影响.

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂和仪器

生物组织脱水机, 生物组织冷冻包埋机, 组织切片机, 摊片烤片机, 光学显微镜, 图像采集系统; CTGF 羊抗大鼠多克隆抗体 (Santa Cruz)、山羊超敏二步法免疫组化检测试剂盒 (中杉金桥); A 型肉毒毒素制品 BOTOXA (兰州生物制品研究所提供).

### 1.2 实验动物的选择与分组

选用 4 周龄雄性 SD 大鼠 54 只, 由昆明医科大学实验动物中心提供, 许可证号: SCXK (滇) 2005-0008. 无明显全身疾患、牙周健康、无失牙及进食异常. 随机分组: 颞肌切除组、肉毒神经毒素 A 注射咬肌组 (咬肌阻断组) 和空白对照组.

### 1.3 动物模型的建立

颞肌切除组: 手术切除其右侧喙突并切断颞肌. 咬肌注射组: 分别于其下颌骨升支中央和下颌骨下缘中点上约 5 mm 注射 A 型肉毒毒素 0.5 U. 空白对照组不作处理. 分别于术后 3、6、9 周麻醉处死动物, 每组 6 只.

### 1.4 免疫组化检测 CTGF

免疫组化染色采用山羊超敏二步法, 石蜡切片经烤片、水化后滴加 3% 过氧化氢去离子水室温闭光孵育 10 min, 以阻隔内源性过氧化物酶的活性. PBS 冲洗, 滴加一抗 (CTGF) 工作液, 室温孵育 120 min. PBS 冲洗, 试剂 1 (Polymer Helper), 室温孵育 15 min. PBS 冲洗, 滴加试剂 2 (poly-HRPanti-Goat IgG), 室温孵育 15 min. PBS 冲洗, 加 DAB 溶液显色, 自来水充分冲洗、复染、脱水、透明、封片.

### 1.5 统计学分析

应用 SPSS 统计软件进行统计学分析, 采用方差分析进行统计分析, 结果以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义. 若有差异, 则进一步进行两两比较, 多组与对照组间的比较用 Dunnett  $t$  检验, 两两比较用 SNK 法.

## 2 结果

CTGF 免疫组化染色以胞浆棕黄色着色为阳性. 所有切片均在相同放大倍数 ( $\times 200$ )、相同光强度下随机取 6 个视野拍照, 用 HPIAS-1000 高清晰度彩色图文分析系统分析处理, 测定每个视野的平均灰度值. 平均灰度值介于 0 ~ 255 之间, 平均灰度值越大, 阳性表达越弱. CTGF 蛋白在各组大鼠髁突软骨成软骨细胞层及肥大层均有表达, 将颞肌切除组和咬肌注射组统归为实验组, 并对各组大鼠髁突软骨层 CTGF 表达的平均灰度值进行比较. 统计分析结果表明,  $F = 7.759$ ,  $P = 0.005 < 0.05$ , 差异有统计学意义, 可认为术后 9 周表达强度强于术后 6 周, 术后 6 周强于术后 3 周 (图 1 ~ 2);  $F = 0.545$ ,  $P = 0.382 > 0.05$ , 差异无统计学意义, 可认为实验组在同一时间点手术侧与非手术侧比较无统计学差异;  $F = 1.276$ ,  $P = 0.000 < 0.05$ , 差异有统计学意义, 可认为实验组及空白对照组在同组不同时间点间有差异;  $F = 6.424$ ,  $P = 0.000 < 0.05$ , 差异有统计学意义, 可认为实验组和空白组比较, 在同一时间点有统计学差异见表 1. 3 个组的 CTGF 免疫组化染色见, 图 3 ~ 5.

## 3 讨论

髁突是颞下颌关节的重要组成部分, 处于一个十分复杂的生物力学系统中, 髁突软骨的生长在直接受咀嚼力影响的同时又与肌肉的活动密切相关. 髁突软骨是颞下颌关节髁突的应力敏感区, 作为继发性软骨, 其正常生长发育需要功能负荷的刺激. 在正常生理情况下, 这一功能负荷主要是由咀嚼时加在牙合面的咀嚼力传导至髁突软骨所产生的, 所以正常的咀嚼力对于维持和促进髁突的生长、发育十分必要, 而咀嚼力的改变将影响髁突的生长方式. 本研究造成一侧咀嚼肌功能不全, 致使整个口颌系统应力紊乱, 实验组双侧关节应力均发生不良改变, 因此双侧髁突软骨均出现病理改变.

Aila Poikela<sup>[1]</sup>提出, 在生长发育期, 髁突软骨基质对咀嚼力的刺激很敏感, 咀嚼力降低抑制了下颌髁突的生长. Basdra<sup>[2]</sup>的研究显示, 在压力下培

养, 软骨细胞的伸展受到抑制, 表达为软骨形成, 同时还有蛋白磷酸化状态的改变, 并伴有不同的

表现型. 这些变化可能使软骨细胞进入更成熟的状态, 即肥大状态, 以加速分化、成熟的过程,

表 1 术后 3 周、6 周和 9 周大鼠髁突软骨层 CTGF 表达的平均灰度值比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 1 Comparison of the average grey degree of CTGF in condylar cartilage layer 3 weeks, 6 weeks and 9 weeks after operation between three groups ( $\bar{x} \pm s$ )

时 间	颞肌切除组		咬肌阻断组		空白对照组
	手术侧 (R)	非手术侧 (L)	手术侧 (R)	非手术侧 (L)	
术后 3 周	142.83 ± 13.04*	145.37 ± 6.00*	144.63 ± 11.43*	150.60 ± 4.30*	166.26 ± 4.27
术后 6 周	149.08 ± 3.47* <sup>△</sup>	149.70 ± 7.81* <sup>△</sup>	138.72 ± 6.24* <sup>△</sup>	134.28 ± 7.23* <sup>△</sup>	158.06 ± 4.08 <sup>△</sup>
术后 9 周	134.85 ± 16.90* <sup>△</sup>	149.90 ± 5.20* <sup>△</sup>	137.72 ± 4.52* <sup>△</sup>	138.47 ± 8.82* <sup>△</sup>	161.66 ± 2.36 <sup>△</sup>

与空白对照组比较, \* $P < 0.05$ ; 同组, 与前一时间比较,  $\Delta P < 0.05$ .

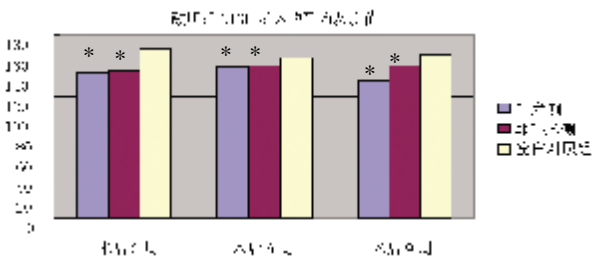


图 1 颞肌切除组 CTGF 平均灰度值

Fig. 1 The average grey degree of CTGF in the group of excising the unilateral temporalis

与空白对照组比较, \* $P < 0.05$ .

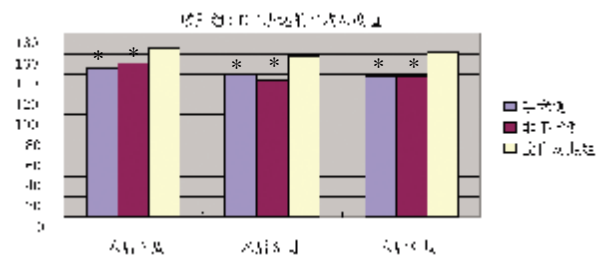


图 2 咬肌阻断组 CTGF 平均灰度值

Fig. 2 The average grey degree of CTGF in the group of injecting the unilateral masseter

与空白对照组比较, \* $P < 0.05$ .

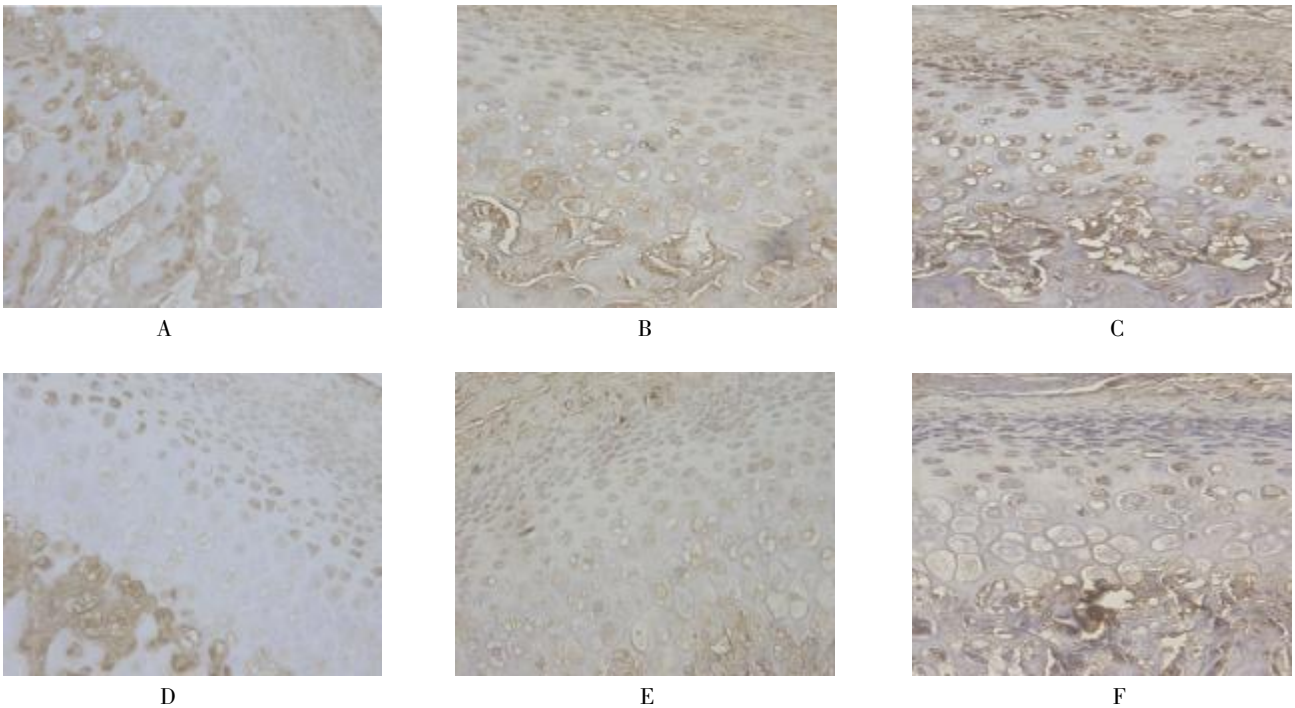
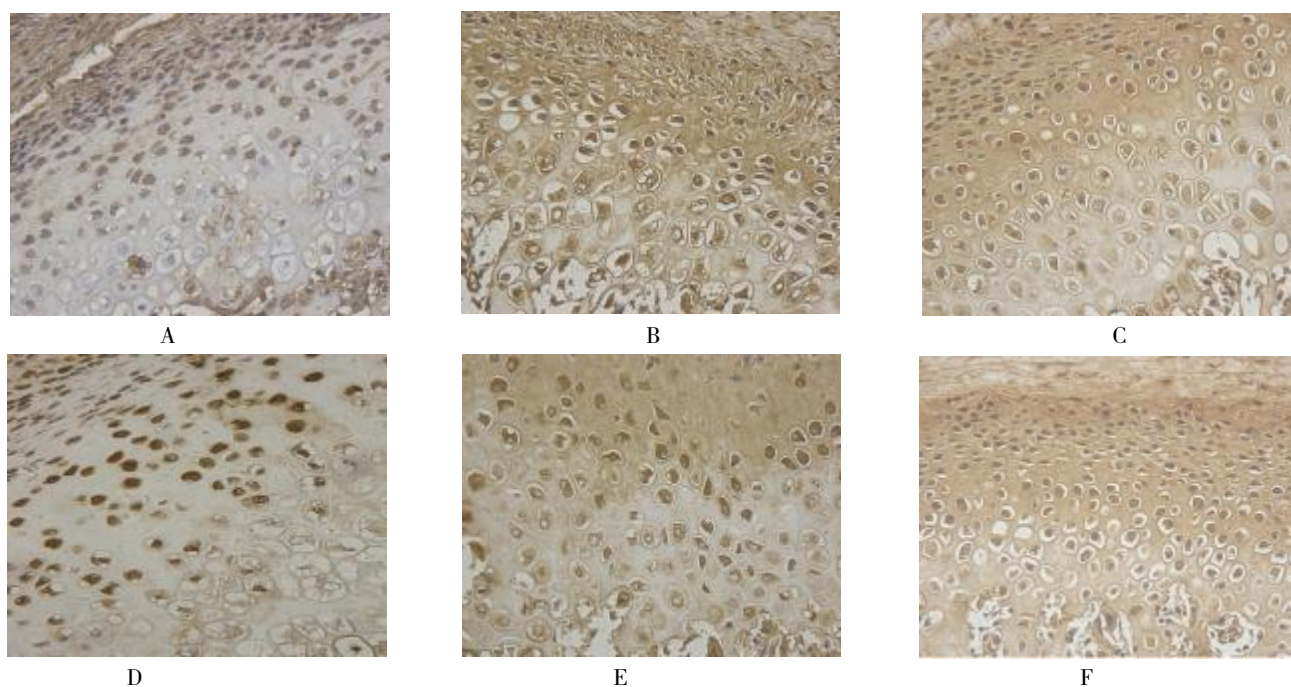


图 3 颞肌切除组 CTGF 免疫组化染色 ( $\times 200$ )

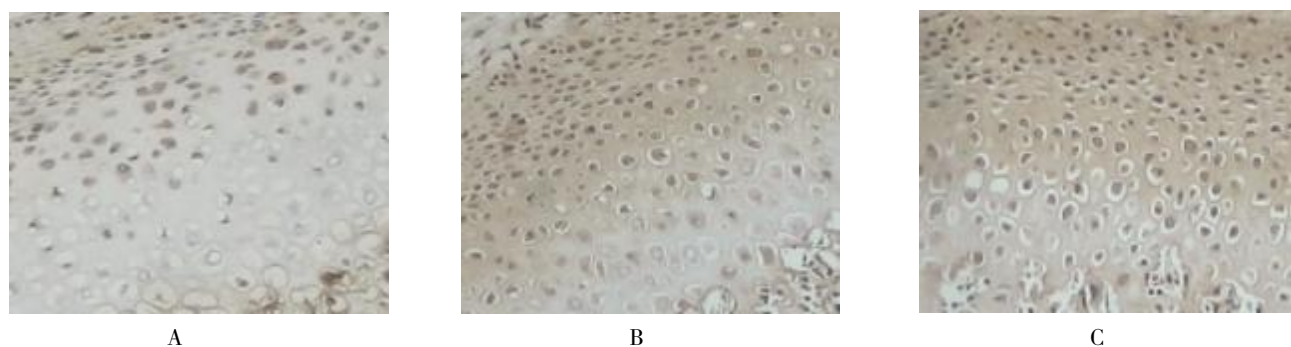
Fig. 3 CTGF immunohistochemical staining in the group of excising the unilateral temporalis ( $\times 200$ )

A: 非手术侧术后 3 周; B: 非手术侧术后 6 周; C: 非手术侧术后 9 周;

D: 手术侧术后 3 周; E: 手术侧术后 6 周; F: 手术侧术后 9 周.

图 4 咬肌阻断组 CTGF 免疫组化染色 ( $\times 200$ )Fig. 4 CTGF immunohistochemical staining in the group of injecting the unilateral masseter ( $\times 200$ )

A:非手术侧术后 3 周; B:非手术侧术后 6 周; C:非手术侧术后 9 周;  
D:手术侧术后 3 周; E:手术侧术后 6 周; F:手术侧术后 9 周.

图 5 空白对照组 CTGF 免疫组化染色 ( $\times 200$ )Fig. 5 CTGF immunohistochemical staining in the blank control group ( $\times 200$ )

A:SD 大鼠 7 周龄; B:SD 大鼠 10 周龄; C:SD 大鼠 13 周龄.

并最终影响组织的整体生长. Hu Y 等<sup>[9]</sup>的研究发现髁突骨折可导致下颌骨和髁突的不对称改建, 手术侧与非手术侧髁突软骨中 CTGF 和 II 型胶原表达不一致. Sugiyama 等<sup>[10]</sup>造成 4 周龄大鼠后牙咬合升高后, 观察到 TMJ 髁突软骨增殖层和肥大层明显变薄、软骨细胞体积减小. Tav 对长期习惯性单侧咀嚼患者面形进行研究, 观察到长期习惯性单侧咀嚼可使非咀嚼侧的下颌支和下颌体发育异常, 而咀嚼侧的髁突相对生长过度, 导致单侧下颌骨拉长, 颞部偏斜, 并形成对侧的牙反颌或同侧牙开颌畸形<sup>[1]</sup>. 由此可见, 咀嚼力降低对髁突软骨发

育影响的途径并不是单一的, 可能存在多种已知和未知的途径, 将力学信号进行传递和转导, 对软骨细胞的代谢活动产生影响.

生理状态下, 颌、咀嚼肌、颞下颌关节在功能上协调一致, 两侧颞下颌关节无论是在结构上还是运动时都是对称一致的, 而两侧咀嚼肌的收缩在时间和强度上彼此保持同步, 协调对称, 施力于两侧颞下颌关节上的负荷也基本对称. 而当一侧咀嚼肌功能不全时, 打破了口腔系统原有的平衡, 导致另一侧咀嚼肌功能发生相应改变, 这样双侧髁突及下颌骨所受应力均发生变化. Ikuo Yonemitsu 等<sup>[11]</sup>通

过切除大鼠双侧咬肌建立咀嚼力降低模型,经 X 线观察发现其下颌角变大,提示咀嚼力与下颌骨形态密切相关.Tae-Geon Kwon 等<sup>[7]</sup>还发现家兔单侧咬肌萎缩将导致同侧下颌支高度、颧弓长度的降低。

结缔组织生长因子 (connective tissue growth factor, CTGF) 是软骨细胞生长分化过程中的关键性生长因子,作为一种软骨特异性基因表达产物,在促进软骨细胞的增殖、分化以及骨骼的生长、改建方面发挥重要作用。研究发现生理状态下 CTGF 在静息组织中仅少量表达<sup>[8]</sup>,但在本研究中,由于口颌系统咀嚼肌力的平衡被打破,双侧髁突软骨处于不对称的应力状态下,软骨细胞 CTGF 的表达可显著上调。对体外培养细胞的研究发现,物理性、化学性刺激因素均可快速诱导细胞 CTGF 和 Cyr61 的高表达,并对细胞产生持久的影响,导致细胞的表型特征和合成分泌功能的改变<sup>[9,10]</sup>。Nakanishi 等<sup>[11]</sup>发现处于生长期体外培养兔软骨细胞可高水平的表达 CTGFmRNA,而处于休眠期的软骨细胞和成骨细胞则几乎不表达。CTGF 的过表达,可促进 HCS-2/8 细胞的增殖,促进软骨聚集蛋白多糖分泌和 X 型胶原的表达。同样,重组的 CTGF 蛋白可促进 HCS-2/8 细胞和兔生长板软骨细胞的增殖,促进蛋白聚糖的合成,促进 II 型胶原和软骨聚集蛋白多糖的表达。这些研究说明,CTGF 可促进生长软骨细胞增殖、分化,并形成软骨内成骨。Nishida 等<sup>[12]</sup>将 CTGFmRNA 导入兔关节软骨细胞,研究发现 CTGF 可促进关节软骨细胞的增殖和分化,而不促进其肥大或矿化。CTGF 对兔生长软骨细胞和关节软骨细胞的不同作用可能与取决于这两种类型的软骨细胞的分化特征差异有关,说明 CTGF 可能介导了压应力对髁突软骨的改建过程。

正常的咀嚼肌力维持着生长发育期髁突软骨中细胞增殖和细胞凋亡的平衡,这对于髁突软骨的改建是十分必要的。当咀嚼力降低,髁突软骨中的细胞感知功能负荷的改变,并通过诱导与凋亡相关蛋白及基因的表达改变,调控髁突软骨中细胞的凋亡,加速了软骨中细胞的分化、成熟,打破了细胞增殖和细胞凋亡之间的平衡,从而影响了髁突软骨的正常发育。本研究结果显示:手术切除一侧颞肌和肉毒神经毒素 A 注射一侧咬肌,实验组双侧髁突软骨中 CTGF 的表达均较空白对照组上调,手术侧与非手术侧髁突软骨 CTGF 表达无明显差异,提示双侧咀嚼肌力的对称与协调作用是髁突正常生长发育的重要生物学基础,咀嚼肌收缩力对髁突改建影响的力学信号转导机制有待进一步研究。

本实验对临床中常见的深覆殆、深覆盖、反

牙合等咬合畸形,以及牙列缺损、缺失等导致的咀嚼肌力发生改变而引起的颞下颌关节紊乱病的发生发展有一定的临床指导意义。

#### [参考文献]

- [1] AILA POIKELA, TUOMO KANTOMAA, PERTTI PIRT-TINIEMI, et al. Unilateral Masticatory Function Changes the Proteoglycan Content of Mandibular Condylar Cartilage in Rabbit [J]. *Cells Tissues Organs*, 2000, 167 (3): 49 - 57.
- [2] BASDRA EK, HUBER L, KOMPOSCH G, et al. Mechanical loading triggers Specific biochemical responses in mandibular condylar chondrocytes [J]. *Biochimica Biophysica Acta*, 1994, 1 222(2): 315 - 322.
- [3] HU Y, YANG H F, LI S, et al. Condyle and mandibular bone change after unilateral condylar neck fracture in growing rats [J]. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2012, 41 (8): 912 - 921.
- [4] SUGIYAMA H, LEE K, IMOTO S. Influences of vertical occlusal discrepancies on condylar responses and craniofacial growth in growing rats [J]. *Angle Orthod*, 1999, 69 (4): 356 - 364.
- [5] TAV D K. Physiognomy in the classification of individuals with a lateral preference in mastication [J]. *J Orofacial Pain*, 1994, 8 (1): 61 - 72.
- [6] IKUO YONEMITSU, TAKESHI MURAMOTO, KUNIMICHI SOMA. The influence of masseter activity on rat mandibular growth [J]. *Archives of Oral Biology*, 2007, 52 (11): 487 - 493.
- [7] TAE-GEON KWON, HYO-SANG PARK, SANG-HAN LEE, et al. Influence of Unilateral Masseter Muscle Atrophy on Craniofacial Morphology in Growing Rabbits [J]. *Oral Maxillofac Surg*, 2007, 65(7): 1 530 - 1 537.
- [8] NISHIDA T, KUBOTA S, KOJIMA S, et al. Regeneration of Defects in Articular Cartilage in Rat Knee Joints by CCN2 (Connective Tissue Growth Factor) [J]. *J Bone Miner Res*, 2004, 19(8), 1 308 - 1 319.
- [9] 彭程, 林绵辉, 肖涛. 细胞因子与软骨损伤修复及研究进展 [J]. *国际骨科学杂志*, 2006, 27(4): 239 - 243.
- [10] GOLDBERG A J, LEE D A, BADER D, et al. Autologous chondrocyte implantation. Culture in a TGF-beta-containing medium enhances the re-expression of a chondrocytic phenotype in passaged human chondrocytes in pellet culture [J]. *Bone Joint Surg Br*, 2005, 87(1): 128 - 134.
- [11] NAKANISHI T, NISHIDA T, SHIMO T, et al. Effects of CTGF/HCS24, a Product of a hypertrophic chondrocyte-specific gene, on the Proliferation and differentiation of chondrocytes in culture [J]. *Endocrinology*, 2000, 141(1): 264 - 273.
- [12] NISHIDA T, KUBOTA S, NAKANISHI T, et al. CTGF/HCS24, a hypertrophic chondrocyte-specific gene product, stimulates proliferation and differentiation, but not hypertrophy of cultured articular chondrocytes [J]. *J Cell Physiol*, 2002, 196(2): 55 - 63.

(2013-08-09 收稿)