

功能矫形前伸青春期大鼠下颌后浅层嚼肌细胞凋亡的研究*

杜衍晓¹ 杨竹丽² 达雨¹ 田臻¹ 王梦佳¹ 阎潇¹ 郑如松¹ 袁晓^{2△}

(1 青岛大学医学院附属青岛市市立医院 山东 青岛 266021 2 青岛市市立医院 山东 青岛 266071)

摘要 目的:研究功能矫形前伸大鼠下颌后浅层嚼肌细胞凋亡的变化规律,探讨功能矫形的肌肉改建机理。方法:选用50只5周龄Sprague-Dawley(SD)雄性大白鼠,随机分为实验组和对照组各25只。实验组大鼠戴自制上颌功能矫治器,引导下颌前伸,并打开咬合。利用RT-PCR方法检测两组大鼠浅层嚼肌Bcl-2和Bax基因表达情况,利用TUNEL方法检测浅层嚼肌细胞凋亡情况。结果:①Bcl-2和Bax基因表达随大鼠戴用矫治器时间的延长而升高,至第3周开始下降但仍高于对照组,但Bax的表达高于Bcl-2。Bax/Bcl-2比值随大鼠戴用矫治器时间的延长而升高,至第4周开始下降。②TUNEL实验结果显示浅层嚼肌细胞在戴用矫治器1天后,开始出现凋亡,随着时间延长而增加,至第3周达到顶峰,第4周开始下降。结论:①Bax/Bcl-2比值升高促进浅层嚼肌细胞凋亡。②功能矫形可引起浅层嚼肌细胞凋亡,导致肌肉的结构和功能发生适应性改建。

关键词 功能矫形 浅层嚼肌 细胞凋亡

中图分类号:Q95-3 R783.5 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)06-1048-04

Superficial Masseter Muscle Cells Apoptosis after Function Mandibular Advancement in Juvenile Rats*

DU Yan-xiao¹, YANG Zhu-li², DA Yu¹, TIAN Zhen¹, WANG Meng-jia¹, YAN Xiao¹, ZHENG Ru-song¹, YUAN Xiao^{2△}

(1 Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao Shandong 266021, China;

2 Qingdao Municipal Hospital, 266071, Qingdao, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the relationship of the apoptotic superficial masseter muscle cells after functional mandibular advancement on juvenile rats. **Methods:** Fifty 5-week-old male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into experimental and control groups. The mimic functional appliances were used in experimental groups, and the rats of two groups were killed on 1st, 7th, 14th, 21th, 28th day. The terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine 5-triphosphate nick and labeling (TUNEL) and Hoechst 33258 method was used to detect superficial masseter muscle cells apoptosis. Bax and Bcl-2 expression was detected by PCR. **Results:** ① Bax and Bcl-2 expression and the value of Bax/Bcl-2 increased after insertion of the appliance, and reach the peak on the 21st day then decreased. ② The apoptotic cells increased after insertion of the appliance, and reach the peak on the 21st day then decreased. **Conclusion:** ① The increased value of Bax/Bcl-2 promoted superficial masseter muscle cells apoptosis. ② Superficial masseter muscles cells appeared apoptosis and rebuilt after functional mandibular advancement.

Key Words: Functional orthopedics; Superficial masseter muscles; Apoptotic

Chinese Library Classification: R783.5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)06-1048-04

前言

功能矫形导下颌向前作为一种行之有效的办法,矫治骨性II类错颌畸形,已经在临床上得到广泛应用,是口腔正畸学中早期治疗儿童骨性或功能性下颌后缩畸形的主要方法,其中,浅层嚼肌是前伸下颌的主要肌肉之一。Graber曾指出:肌肉功能与面颌形态相关。当骨骼与肌肉相互有冲突时,骨骼会产生适应性的改变。同时,肌肉也会对骨骼产生适应性改建^[1]。近年来,许多学者对功能矫形下的髁突改建及激素和生长因子在功能矫形中的调控机制做了深入研究^[2-3]。细胞凋亡在功能矫形中肌肉适应性改建过程中起着重要作用,目前关于这方面的研究较少。本研究采用功能矫形方法前伸青春期大鼠下颌,观察浅

层嚼肌细胞的凋亡变化规律,探讨功能矫形状态下肌肉改建的机制。

1 材料与方法

1.1 动物

实验组:选用5周龄,雄性Sprague-Dawley(SD)大白鼠(SPF级)50只,体重130±5g。随机分为实验组和对照组,每组大鼠5只。

1.2 实验方法与步骤

1.2.1 大鼠前伸下颌模型的建立 对照组大鼠不戴用矫治器,实验组大鼠佩戴可摘式上颌斜面导板功能矫治器^[4],每天戴用12h 8:00-20:00。斜面导板与牙合平面呈30°-40°,当大鼠闭

* 基金项目:国家自然科学基金(30770528)资助;青岛市科技局科技支撑计划(10-3-3-4-4-nsh)

作者简介:杜衍晓(1983-),男,硕士研究生,主要研究方向:口腔正畸学 E-mail:yanxiaodu@126.com

△通讯作者:袁晓,电话:0532-88905346 E-mail: yuanxiaod@163.com

(收稿日期:2010-12-05 接受日期:2010-12-31)

合时,下切牙咬在斜面导板上,下颌前伸约 3mm,咬合打开约 3mm,引导下颌前伸并打开咬合。实验组大鼠分别戴用矫治器 1d、1w、2w、3w、4w。实验组大鼠自由供给饮食,对照组大鼠限制饮食,自由饮水,以保证两组动物体重增加量相当。

1.2.2 标本取材 各实验组及其相应对照组动物分别于第 1d、1w、2w、3w、4w,采用断颈法相继处死,取双侧浅层嚼肌。分别留取部分组织用于 RNA 提取,另将部分组织置于 4%多聚甲醛中固定 12h,常规石蜡包埋切片,连续切片,3 μm/片,用于免疫组化和细胞凋亡的检测。

1.2.3 RT-PCR 采用北京百泰克生物技术有限公司的高纯总 RNA 快速提取试剂盒(离心柱型)提取新鲜浅层嚼肌组织总 RNA,经核酸蛋白分析仪(Eppendorf BioPhotometer plus)测定 RNA 浓度,逆转录反应体系为 0.5 μg 总 RNA,1 μL Oligo (dT),1 μL dNTP Mixture,加 RNA Free H₂O 至总体积 14 μL。置于 PCR 仪(MultiGene)上,65℃ 5 分钟,置于冰上急冷。在上

述 PCR 管中加入以下反应液:4 μL 5× first-strand Buffer, 1 μL M-Mulv Reverse Transcriptase, 1 μL Rnase Inhibitor 至总体积 20 μL。PCR 反应体系包括 2 μL cDNA,上下引物^[5-7](表 1)(10 μmol/L)各 1 μL,2× Master Mix 10 μL, RNA-Free H₂O 6 μL,共 20 μL。以 β-actin 做内参照,反应步骤如下:① β-Actin 和 Bax:95℃ 预变性 5 分钟,95℃ 变性 30 秒,55℃ 退火 30 秒,72℃ 延伸 40 秒,40 个循环,72℃ 钟末延伸 10 分钟。② Bcl-2:95℃ 预变性 5 分钟,95℃ 变性 30 秒,62℃ 退火 30 秒,72℃ 延伸 40 秒,40 个循环,72℃ 钟末延伸 10 分钟。各取 5 μL 目的基因和内参照 PCR 产物,2.5% 琼脂糖凝胶(50 μL/2.5 μL Goldview 核酸染料液)电泳(100V,30min,北京六一公司水平电泳仪)。利用凝胶成像分析系统(Gel Doc 2000 BioRad 公司),测定目的基因 PCR 产物条带与 β-actin 产物条带的吸光度(A),计算两者比值作为目的基因的相对表达量。

表 1 Bcl-2、Bax 和 β-actin 引物序列及预期扩增产物长度

Table.1 Sequence of Primers Bcl-2,Bax and β-actin

| Substance | Primer | Sequence | Expanded product (bp) |
|-----------|----------------|-------------------------------|-----------------------|
| Bcl-2 | Forward Primer | 5'-GGAGGATTGTGGCCTTCTTTGAG-3' | 271bp |
| | Reverse Primer | 5'-TATGCACCCAGAGTGATGCAGGC-3' | |
| Bax | Forward Primer | 5'-GAGCTGCAGAGGATGATTG-3' | 186bp |
| | Reverse Primer | 5'-GATGTTCTGATCAGCTCG-3' | |
| β-actin | Forward Primer | 5'-GCCCTAGACTTCGAGC-3' | 217 bp |
| | Reverse Primer | 5'-CTTTACGGATGTCAACGT-3' | |

1.2.4 TUNEL 法检测细胞凋亡 实验步骤按试剂盒(罗氏)说明书操作。结果判定:高倍镜下观察,凋亡细胞核呈棕黄色或棕褐色,正常细胞核呈蓝色。每例标本随机取 10 个高倍视野(400 倍),至少计数 1000 个细胞中凋亡细胞所占的百分比,即凋亡指数(apoptosis index, AI),计算公式为:骨骼肌细胞凋亡率 = 凋亡细胞核 / (凋亡细胞核 + 正常细胞核) × 100%。

1.3 统计学分析

各分组所得计量数据采用均数± 标准差($\bar{X} \pm S$)表示,采用 SPSS17.0 统计软件分别针对不同时间段进行实验组与对照组之间的独立样本 t 检验分析,以及针对不同组别进行各时间段之间的单因素方差分析。检验水准 $\alpha = 0.05$, $p < 0.05$ 为具有统计学

意义。

2 结果

2.1 浅层嚼肌组织 Bax、Bcl-2 mRNA 水平的表达

各组大鼠浅层嚼肌组织提取总 RNA,RT-PCR 后电泳结果(图 1)。目的基因 Bax/Bcl-2 灰度值比值结果(图 2)。对照组内,各试验天数之间无显著性差异;实验组内各不同时间段,除 1 周组和 4 周组、2 周组和 3 周组之间无显著性差异外,其他各组间均有显著性差异。Bax/Bcl-2 比值自第 1 天开始上升至 21 天达到高峰,开始回落。不同时间段,实验组和对照组之间比较除 1 天组外,其余各组之间均有显著性差异。

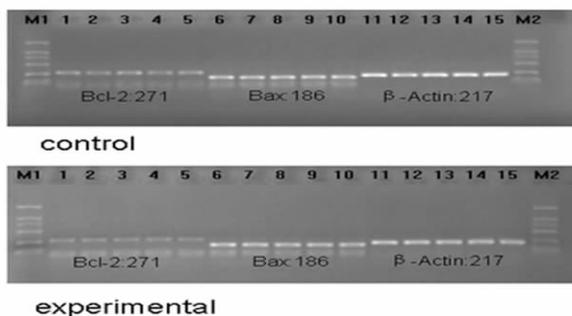


图 1 Bcl-2、Bax、β-actin PCR 产物电泳图

Figure1 Expression of Bcl-2,Bax, β-actin mRNA in superficial masseter muscle by RT-PCR

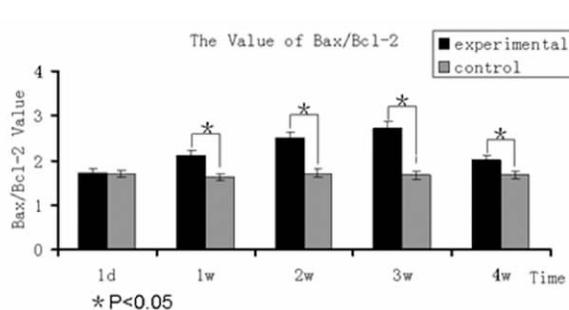


图 2 Bax/bcl-2 比值的变化

Figure 2 The expression of myogenin mRNA in superficial masseter muscles

2.2 浅层嚼肌细胞凋亡的发生

大鼠浅层嚼肌组织石蜡切片, 凋亡检测 TUNEL 法 DAB 染色。显微镜下显示凋亡细胞的胞核呈棕黄色颗粒状 散在分

布(图 3)。分析结果如图 4, 对照组内, 各试验天数之间无显著性差异; 实验组内各不同时间段之间均有有显著意义。不同时间段, 实验组和对照组之间比较均有显著性差异。

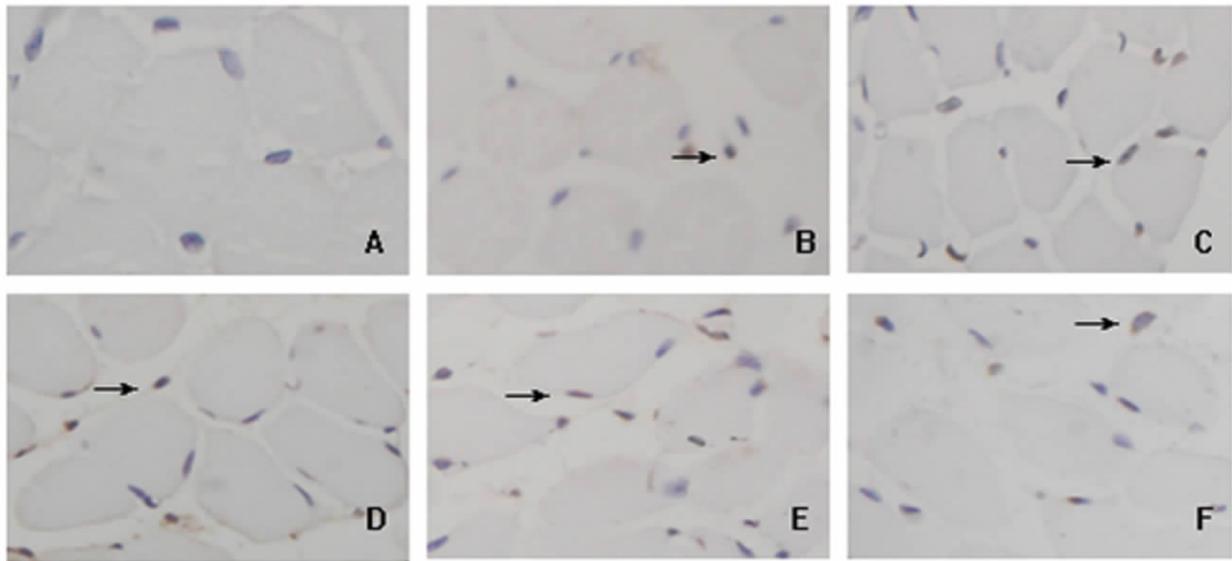


图 3 A、B、C、D、E、F 依次为对照组、1 天组、1 周组、2 周组、3 周组、4 周组。→为凋亡细胞(400×)

Figure 3 From A to F is group control, group 1 day, 1w, 2ws, 3ws and group 4ws. → means apoptotic cells(400×)

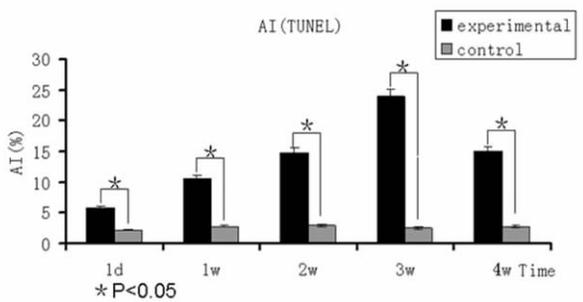


图 4 TUNEL 法检测细胞凋亡率(AI)

Figure 4 The detection of apoptosis index(AI) by TUNEL.

3 讨论

3.1 生长发育对浅层嚼肌细胞凋亡的影响

生长发育高峰期和高峰前期是临床功能矫治的最佳时机, 故本实验选用生长发育前期的雄性 Sprague-Dawley(SD)大鼠为研究对象。结果表明, 对照组大鼠自 5 周龄开始, 1 天, 1 周, 2 周, 3 周, 4 周, 浅层嚼肌细胞凋亡未发生显著性变化。虽然有研究表明, 哺乳动物, 包括人类, 在胎儿肌肉发育的早期, 高于 40% 的肌细胞要通过凋亡来清除^[8]。但本研究表明自生长发育高峰前期的第 5 周开始, 在骨骼肌的成熟过程中, 细胞凋亡未有显著性变化, 自第 5 周到第 9 周, Wistar 大鼠的生长发育高峰期阶段, 骨骼肌的生长发育对浅层嚼肌细胞凋亡并无显著影响。

3.2 功能矫形对浅层嚼肌细胞凋亡的影响

功能矫形通过矫治器持续牵张咀嚼肌及口周肌, 使其产生的收缩力传递到牙、牙周膜、颌骨等部位, 促进软硬组织发生适应性改建, 重建新的功能形态平衡。其中, 浅层嚼肌是参与咀嚼

和功能矫形治疗的主要肌肉, 功能矫形治疗中前伸下颌及打开咬合均与浅层嚼肌的功能状态有关。故浅层嚼肌细胞的在肌收缩力的调控下发生的适应性改建在功能矫治以及疗效的维持和稳定中起着重要作用。

王昕等研究证明在功能矫形力作用下, 浅层嚼肌肌小节数增多, 肌小节长度减少。提示在功能矫形力的作用下, 大鼠浅层嚼肌在功能和结构上都产生了相应的适应性变化^[9]。宋锦璘等通过对大鼠翼外肌成肌细胞施加交变应力观察对其形态学改建的影响, 发现不同的交变应力对大鼠翼外肌成肌细胞形态学改建具有一定的影响, 在一定范围内的交变应力可以促进成肌细胞在二维方向的排列^[10]。

凋亡可能是一个被骨骼肌所利用的生理性机制, 以适应其被改变的结构和形态的功能需要。Donatella B 等的结果证明凋亡并不限于病理性肌肉, 也可以发生在正常成熟的骨骼肌纤维^[11]。袁晓等的体外细胞研究表明成肌细胞在周期性张应力下可以发生凋亡, 提示应力是引起成肌细胞凋亡的重要因素^[12]。但动物实验不同于细胞实验, 调控途径非常复杂, 不仅受力学刺激的影响, 还受到神经体液的调节。本实验在 m-RNA 水平检测了浅层嚼肌细胞 Bcl-2 和 Bax 的表达结果。随着大鼠戴用矫治器时间的延长, 浅层嚼肌处于持续收缩状态, Bcl-2 和 Bax 基因的表达均增高, 但 Bcl-2 基因的表达强度比 Bax 要弱。Bax / Bcl-2 比值随着大鼠戴用矫治器的时间延长而升高, 至第 3 周到达顶峰, 第 4 周开始降低, 但仍高于对照组。大鼠戴用矫治器 1 天, 实验组和对照组之间无显著性差异, 可能与大鼠戴用矫治器后刚开始激活基因启动表达, 处于表达的早期阶段有关。1 周组和 4 周组、2 周组和 3 周组之间没有显著性差异, 可能与大鼠戴用矫治器 1 周后, 激活基因, 其表达处于上升期, 但第 2 周和第 3 周表达差异不明显, 第 3 周达到峰值后, 到第

4 周时基因表达产生适应,处于下降期有关。在众多凋亡相关基因中, Bcl-2x 基因家族成员是主要的调控因子。Bcl-2 能够抑制细胞的凋亡, Bax 的作用则正好相反^[13]。Bax / Bcl-2 比值大小决定了促进凋亡还是抑制凋亡。Bax / Bcl-2 比值升高则促进凋亡。Tews DS 发现大鼠面肌失去神经支配后凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 表达处于高水平,恢复神经支配 7 周后 Bcl-2 表达增高, Bax 表达下降,认为大鼠面肌失去神经支配后 Bcl-2 的高表达有助于维持肌细胞的存活,持续增加的 Bcl-2 的表达可以对抗 Bax 促进凋亡的作用^[14]。本实验结果表明,在功能矫形力的作用下, Bcl-2x 家族基因表达发生了相应变化,参与调控了浅层嚼肌细胞的凋亡。

TUNEL 法检测细胞凋亡,具有灵敏性和特异性高的优点,且可定量,适合于机制的研究。TUNEL 法是用生化方法特异地标记凋亡细胞,因此可以将凋亡细胞与坏死细胞、活细胞区分开,凋亡细胞表现增强的荧光,而坏死细胞和活细胞均不着染荧光。对于从形态上难以区分的细胞,如晚期凋亡细胞与坏死细胞,凋亡小体与具有小核的正常细胞,用 TUNEL 可以将其准确区分。TUNEL 还可用于只有极少的细胞发生凋亡的情况,特别是在正常组织中。TUNEL 与 DNA 水平同时进行检测,可以分析估计凋亡的动态变化^[15]。故本实验用 TUNEL 法并结合 PCR 检测浅层嚼肌细胞凋亡,使实验更加严密。结果显示:在功能矫形过程中,随着大鼠戴用矫治器时间的延长,浅层嚼肌细胞处于长期的被动收缩状态,为适应这种持续的张力活动,浅层嚼肌发生适应性改建,肌细胞的凋亡也随着时间的延长出现增加,实验组细胞凋亡指数各时间段间均有显著性差异。到第 21 天组到达峰值后开始下降,这可能与嚼肌细胞产生了功能和结构上的适应,处于增殖和分化状态的细胞增多,肌细胞发生改建有关,从而引起凋亡指数的降低。可见经过矫形治疗,浅层嚼肌从一个稳态改建过渡到另一个稳态,为了适应新的位置,从而发生了适应性改建。

功能矫形治疗骨性 II 类错颌畸形是正畸临床常用的方法。通过矫治器引导下颌前伸,促进髁状突的生长发育,打开咬合,改变原有异常的肌功能,在经过软硬组织间的适应性改建,建立新的肌功能平衡。本实验浅层嚼肌的变化与治疗目的相一致,可能参与建立新的肌功能平衡,为临床巩固和维持疗效奠定功能结构基础。

参考文献(References)

- [1] 徐芸,白玉兴,宋一平.口腔正畸功能矫形治疗学[M].第2版.北京:人民卫生出版社,2004:13-14
Xu Hui, Bai Yu-xing, Song Yi-ping. Dentofacial Orthopedics with Functional Appliances [M]. Second Edition. Beijing: People's Medical Publishing House, 2004:13-14
- [2] 黄宁,陈开云,罗颂椒.青春期大鼠前伸下颌后浅层嚼肌细胞膜乙酰胆碱受体研究[J].华西口腔医学杂志,2008,26(4):365-367
Huang Ning, Chen Kai-yun, Luo Song-jiao. Changes of the acetylcholine receptor on rat's superficial masseter muscles after functional mandibular advancement [J]. West China Journal of Stomatology, 2008, 26(4):365-367
- [3] 倪琳,刘洪臣,徐娟等.功能矫形前伸青春期大鼠下颌对翼外肌 Na⁺/K⁺-ATPase 功能活性的影响 [J].口腔颌面修复学杂志,2009,10

- (6):324-326
NI Lin, LIU Hong-chen, XU Juan, et al. Effect of functional appliance on the activity of Na⁺/K⁺-ATPase in lateral pterygoid muscle of juvenile rats[J]. Chinese Journal of Prosthodontics, 2009,10(6):324-326
- [4] 倪琳.功能矫形前伸青春期大鼠下颌对翼外肌及颞肌后份 Na⁺/K⁺-ATPase 功能状态的影响[D].四川大学博士论文,2006
NI Lin. Effect of functional appliance on the activity of Na⁺/K⁺-ATPase and the expression of its α subunits in lateral pterygoid muscle and posterior portions of temporalis of juvenile rats[D]. Sichuan University, 2006
- [5] Lai KW, Wei CL, Tan LK et al. Overexpression of interleukin-13 induces minimal-change-like nephropathy in rats[J]. J Am Soc Nephrol. 2007,18(5):1476-85
- [6] 李毓雯,万小华,宁琴,等.铜过量负荷导致肝细胞凋亡及其对 Bax Bcl-2 基因表达的影响[J].中国当代儿科杂志,2008,10(1):42-46
Li Yu-wen, Wan Xiao-hua, Ning Qin, et al. Excessive copper induces hepatocyte apoptosis and effects Bax and bcl-2 expression in rat liver [J]. Chin J Contemp Pediatr, 2008, 10(1):42-46
- [7] Leskinen MJ, Heikkilä HM, Speer MY, et al. Mast cell chymase induces smooth muscle cell apoptosis by disrupting NF-kappaB-mediated survival signaling[J]. Exp Cell Res, 2006, 312(8):1289-98
- [8] Fidziańska A. Human ontogenesis: Ultrastructural characteristics of developing human muscle [J].Neuropathol Exp Neurol,1980, 39(4): 476-486
- [9] 王昕,罗颂椒,杨名仲.矫形力对咀嚼肌结构影响的研究[J].华西口腔医学杂志,1994,12(4):303-305
Wang Xin, Luo Song-jiao, Yang Ming-zhong. Orthopedic force effects masseter muscle structure. West China Journal of Stomatology, 1994, 12(4):303-305
- [10] 宋锦磷,樊瑜波,赵志河等.交变应力对大鼠翼外肌肌细胞形态学改建的影响[J].华西口腔医学杂志,2006,24(5):397-493
Song Jin-lin, Fan Yu-bo, Zhao Zhi-he, et al. Time Varied Stress Effects on the Shape-alteration of Myoblast in Rat [J]. West China Journal of Stomatology, 2006,24(5):397-493
- [11] Donatella B, Puka AJ, Ciecchomska I, et al. Loss of dystrophin and some dystrophin - associated proteins with concomitant signs of apoptosis in rat leg muscle overworked in extension [J]. Acta Neuropathol, 2000,100(6):618-626
- [12] Liu JQ, Liu J, Yuan X et al. Caspase-3-Mediated Cyclic Stretch-Induced Myoblast Apoptosis Via a Fas/FasL-Independent Signaling Pathway During Myogenesis [J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2009, 107(4):834-44
- [13] Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homologue, Bax, that accelerates programmed cell death[J]. Cell, 1993, 74 : 609-619
- [14] Tews DS, Geobel HH, Schneider I, et al. DNA fragmentation and expression of apoptosis-related proteins in experimentally denervated and reinnervated rat facial muscle [J]. Neuropathol Appl Neurobiol, 1997, 23 :141-149
- [15] Gorczyca W, Gong J, Darzynkiewicz Z. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays [J]. Cancer Research, 1993, 53(8):1945-51