

细胞凋亡与 bcl-2 基因在颞颌关节发育中的作用

李松 金岩 王惠芸 李媛

摘要 目的: 本研究通过检测胎鼠及出生后早期颞颌关节发育中的细胞凋亡与 bcl-2 基因表达的变化, 探讨细胞凋亡与 bcl-2 基因在颞颌关节发育中的作用。方法: 利用原位末端标记法(TUNEL)及原位杂交检测mRNA技术, 对胚胎及生后1周SD大鼠颞颌关节发育不同时期细胞凋亡及 bcl-2 基因的表达情况进行观察。结果: 各时期髁状突软骨细胞中均有凋亡细胞出现, 凋亡细胞主要分布于软骨增殖带及浅层肥厚层与深层肥厚层交界的区域; 关节腔开始形成时髁状突软骨表面细胞凋亡明显, 出生后凋亡细胞于关节的功能部位(髁状突前斜面)更明显。bcl-2 原位杂交: 出生前、后的髁状突软骨增殖层及浅肥厚层大部分细胞 bcl-2 表达阳性, 而进入深层肥厚层仅有极少数 bcl-2 阳性表达的成熟软骨细胞散在分布。结论: 由 bcl-2 基因调控的细胞凋亡在颞颌关节发育中起着重要的调控作用。
关键词 细胞凋亡 bcl-2 基因 原位杂交 颞颌关节 发育

近来, 由颞颌关节(TMJ)的发育异常造成的左右关节不对称、关节发育不良及发育期的正畸治疗引起的颞颌关节功能紊乱症(TMD)逐渐受到重视。TMJ发育的研究表明下颌骨髁状突是下颌骨的主要生长区, 在颞颌关节发育的早期, 下颌骨髁状突主要由软骨细胞组成, 此期的下颌骨髁状突的软骨层具有类似于长骨生长板独立生长的特性, 而且髁状突软骨的生长主要是受内在基因的控制¹。有关颞颌关节发育中的细胞凋亡及其调控基因 bcl-2 的研究尚未见报道。本研究通过观察颞颌关节发育中的细胞凋亡(apoptosis)及 bcl-2 基因的表达, 以探讨颞颌关节发育中细胞凋亡与 bcl-2 基因的内在调控作用。

1 材料和方法

1.1 动物模型及标本制备

选用纯系3月龄SD大鼠(上海产)20只, 按雌雄4:1的比例同笼, 每天早晨8:00观察雌鼠阴栓, 以观察到阴栓计为妊娠0d, 分别于妊娠(E)13、14、15、16、17、18、19、20d脱颈处死大鼠, 切取胎鼠颞颌关节部置于4%的多聚甲醛中固定, 另取出生后(P)1、2、3、4、5、6、7d幼鼠颞颌关节部(沿正中中线切开鼠头后分切)置入含盐酸、甲酸及冰醋酸的4%多聚甲醛液中充分固定, 脱钙, 流水冲洗后, 常规脱水, 石蜡包埋。作TMJ矢状切片, 厚度约5 μ m, 分别用于HE、TUNEL染色及原位杂交。切片前载玻片预先严格清洁处理并涂APES胶。

1.2 原位末端标记法(TUNEL法)标记凋亡细胞

TUNEL法(Oncor公司, 美国): 切片常规脱蜡至水, 室温下20 μ g/ml的蛋白酶K消化15min; 3% H₂O₂的PBS溶液中处理5min后, 加50 μ l的平衡液(TUNEL试剂盒原配)1min; 再加含TdT酶反应液15 μ l, 37 $^{\circ}$ C反应1.5h后用预热的中止反应液中止反应(TUNEL试剂盒原配); 缓冲液1漂洗2次(15min/次)后加2%的正常羊血清孵育30min; 滴加抗地高辛碱性磷酸酶抗体置于湿盒中孵育2h; 经缓冲液1、缓冲液3漂洗后, 加新配制的显色液(NBT/BCIP显色系统用缓冲液3配制, NBT4.5 μ l, BCIP3.5 μ l, 左旋咪唑0.24mg/ml)20 μ l, 暗处显色。中止显色后, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明封片。

1.3 原位杂交检测 bcl-2 mRNA 表达

1.3.1 探针及标记 质粒pDOR-SB 8.4(由第四军医大学生物教研室朱峰博士惠赠)含1.9kb的 bcl-2 基因片段。取已鉴定的质粒DNA, 经EcoRI酶切后, 将目的基因用冻溶法回收。bcl-2 探针参照地高辛标记检测试剂盒(Boehringer Mannheim公司)说明书, 采用随机引物法标记。

1.3.2 bcl-2 原位杂交 石蜡切片脱蜡至DEPC水, 分别用0.1mol/L HCl和20 μ g/ml的蛋白酶K处理, 梯度酒精脱水后室温干燥; 用地高辛标记探针于42 $^{\circ}$ C杂交后, 分别用2 \times SSC、1 \times SSC、0.5 \times SSC、缓冲液1、缓冲液2依次充分洗涤; 2%正常羊血清封闭30min后, 滴加抗地高辛碱性磷酸酶抗体反应2h; 经缓冲液1、缓冲液3漂洗后, 加新配制的显色液(NBT/BCIP显色系统)20 μ l, 暗处显色。中止显色后, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明封片。

2 结 果

2.1 HE 染色

E13 d TMJ 区开始出现未分化间充质细胞聚集、增殖、分化为软骨细胞,至 E14 d TMJ 髁状突软骨组织增厚,软骨各层分界明显;E14~ E15 d 关节腔开始形成,E17~ E18 d 关节盘出现;E13 d 即可见下颌骨体部端有骨化出现,以后骨化逐渐扩展到髁状突颈部;出生后关节软骨逐渐变薄,下颌骨骨化接近关节软骨区。

2.2 TUNEL 法染色结果

阳性细胞细胞核呈紫蓝色,凋亡细胞主要分布于软骨增殖带及浅层肥厚层与深层肥厚层交界的区域(图 1, 2),深层肥厚层的成熟软骨细胞多呈空泡样,TUNEL 法不易着色;E14~ E15 d 关节腔开始形成时软骨表面凋亡细胞多(图 3);出生后凋亡细胞也主要分布于软骨增殖带及浅层肥厚层与深层肥厚层交界的区域,凋亡软骨细胞于关节的功能部位(髁状突前斜面、关节结节前斜面)更明显。

2.3 bcl-2 mRNA 原位杂交

bcl-2 阳性反应可出现于细胞浆或细胞核,bcl-2 表达阳性细胞呈紫蓝色,出生前、后的关节髁状突软骨增殖层、浅肥厚层软骨细胞均有明显的表达,而进入深层肥厚层仅有极少数 bcl-2 阳性表达的成熟软骨细胞散在分布。

3 讨 论

细胞凋亡亦称程序化细胞死亡(programmed cell death, PCD),是在基因控制下的一种细胞自我消亡形式。它在胚胎发生、器官发育、变态反应、肿瘤发生及保持机体的稳态中发挥着至关重要的作用²。骨和关节的发育是一个复杂的过程,其间伴随着 PCD 及其调控基因的表达和信号分子的传导,PCD 的紊乱可能导致骨和关节的畸形^{3,4}。TMJ 是结构及功能均复杂的关节,其发育过程中 PCD 的异常可能导致 TMJ 先天性畸形、左右关节不对称等,由此可成为 TMD 及颞颌关节骨关节疾病(TMJOA)的病因^{5,6}。

TUNEL 法染色显示在 TMJ 的发育中(出生前及生后 1 周),下颌髁状突软骨中均有规律性分布的 PCD,PCD 阳性细胞主要位于髁状突软骨的增殖带及浅层肥厚层与深层肥厚层交界的区域。此

结果与 Matsuda 等⁴ 用透射电镜观察到仅于 P1 d 出现髁状突软骨细胞 PCD 不同。一般认为,增殖带是由未分化的间充质细胞构成的,它具有不断增殖、分化为软骨细胞的能力,该区出现的 PCD 可能与增殖带细胞的增殖分化有关,机体通过 PCD 控制软骨细胞的数量达到控制生长速度的目的。Roach 等⁷ 通过鸡股骨生长板的培养研究,发现软骨生长板肥厚层软骨细胞向骨端移动的过程中逐渐凋亡,证实了软骨成骨中凋亡是软骨细胞的主要消亡形式。而本实验中的 PCD 出现于浅层肥厚层与深层肥厚层交界区域,推测可能与软骨细胞的成熟相关,作为继发性软骨的髁状突软骨虽然具有软骨生长板样的生长功能,但与原发性生长板软骨不同。E14~ E15 d 关节腔开始形成时软骨表面 PCD 显著,表明关节腔的形成与 PCD 有关,关节腔可能是临近关节腔面的细胞 PCD 后出现的。出生后由于吮乳、咀嚼及发音等功能的需要,下颌运动频繁,使下颌髁状突软骨功能受力,软骨细胞功能活跃,PCD 也明显。作者认为可能与软骨组织塑形、改建有关。

bcl-2 是 1984 年由 Tsujimoto 等⁸ 从 14 号与 18 号染色体易位的滤泡性淋巴瘤中分离出的一种原癌基因。bcl-2 基因可以编码两个结构相近的 BCL-2 α (26 kD)和 BCL-2 β (21 kD)蛋白,该蛋白属于跨膜蛋白,主要分布于核膜、线立体膜及内质网膜上。已知 bcl-2 可控制核内外物质的运输及抑制 Ca²⁺ 的释放或阻断细胞内过氧化物的堆积而抑制细胞的凋亡。Am ling 等⁹ 用免疫组化证实在整个长骨软骨生长板都有 bcl-2 基因的表达,而且以深层增殖层软骨细胞及浅层肥厚层软骨细胞表达水平高,深层肥厚层细胞表达水平低。Am ling 等⁹ 进一步在剔除 bcl-2 基因的小鼠中发现软骨生长板明显变薄,其主要原因是增殖层细胞减少,剔除 bcl-2 的小鼠可加速软骨细胞的分化,使软骨细胞成熟加快导致整个骨骼变短。说明 bcl-2 调节软骨生长板肥厚层软骨细胞的凋亡是正常骨骼发育及软骨骨化所必需的。bcl-2 在髁状突软骨的表达与长骨生长板相似,表明 bcl-2 也参与了髁状突软骨细胞的增殖、分化、成熟过程。在 Am ling 等的实验中还发现甲状旁腺激素相关肽(PTHrP)的表达分布与 bcl-2 一致。Lee 等¹⁰ 进一步发现 PTHrP 基因阴性的动物生长板肥厚层软骨细胞 PCD 及 bcl-2 表达

减少; PTH rP 基因阳性的动物生长板肥厚层软骨细胞 PCD 及 bcl-2 表达明显, 显示 bcl-2 可能是 PTH rP 下游的发挥抑制软骨细胞分化的基因。由此可见 bcl-2 也可通过抑制软骨细胞分化及调控 PCD 的数量, 达到控制髁状突软骨的生长及关节发育的作用, 髁状突软骨肥厚层中也有少数细胞 bcl-2 表达阳性, 说明此部分细胞具有增殖、分化的能力, 它们可能是软骨肥厚层中不凋亡的细胞, 与 Roach 等⁷ 发现 [³H] 标记的软骨细胞进入肥厚层后并未完全凋亡消失的结果一致, 少部分肥厚层软骨细胞可以分化为成骨样细胞, 对成骨过程起补充的作用。此点反映出软骨细胞功能的多样性。

本研究显示颞颌关节发育过程中的 PCD 及 bcl-2 表达均主要出现于髁状突的增殖层及浅肥厚层, PCD 与 bcl-2 并未见到明显的正相关变化, 这可能是与发育期细胞增殖、分化及凋亡等活动均较旺盛有关。此点有待进一步深入研究。

(本文图见中心插页 10)

4 参考文献

- 1 Copray JCV M, Dibbets J M H, Kantomaa T. The role of condylar cartilage in the development of the temporomandibular joint *Angle Orthod*, 1988, 58(5): 369~ 380
- 2 Michael D J, Miguel W, Martin C R, et al Programmed cell death in animal development *Cell*, 1997, 88: 347~ 354
- 3 Yokouchi Y, Sakiyama J, Kameda T, et al *BMP 2/4*

- mediate programmed cell death in chicken limb buds *Development*, 1997, 122(12): 3725~ 3734
- 4 Zou H Y, Niswander L. Requirement for BMP signaling in interdigital apoptosis and scale formation *Science*, 1996, 272(5262): 738~ 741
- 5 Matsuda S, Mishima K C H, Yoshimura Y, et al Apoptosis in the development of the temporomandibular joint *Anat Embryol*, 1997, 196(5): 383~ 391
- 6 McNamara J A Jr, Turp J C. Orthodontic treatment and temporomandibular disorders: is there a relationship? Part I: Clinical studies *Fortschr Kieferorthop*, 1997, 58(2): 74~ 89
- 7 Roach H I, Erenpreisa J, Aigner T. Osteogenic differentiation of hypertrophic chondrocytes involves asymmetric cell divisions and apoptosis *J Cell Biol*, 1995, 131(2): 483~ 494
- 8 Tsujimoto Y, Finger L R, Yunis J, et al Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14; 18) chromosome translocation *Science*, 1984, 226(4678): 1097~ 1099
- 9 Am ling M, Neff L, Tanaka S, et al Bcl-2 lies downstream of parathyroid hormone-related peptide in the signaling pathway that regulates chondrocyte maturation during skeletal development *J Cell Biol*, 1997, 136(1): 205~ 213
- 10 Lee K, Lanske B, Karaplis A C, et al Parathyroid hormone-related peptide delays terminal differentiation of chondrocytes during endochondral bone development *Endocrinology*, 1996, 137(11): 5109~ 5118

(1998-07-28 收稿)

Role of Apoptosis and bcl-2 Gene in the Temporomandibular Joint Development

Li Song, Jin Yan, Wang Huiyun, et al

Stomatological College, the Fourth Military Medical University

Abstract

Objective: Apoptosis involving in embryogenesis and organ formation has been verified, but the possible roles of apoptosis and its related regulative genes have not been clarified. Temporomandibular joint dysfunction (TMD) has increased in incidence and occurred increasingly in young patients. Thus, research on the development and gene modulation is necessary. **Methods:** Tdt-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) and mRNA in situ hybridization were used in observation of apoptosis and bcl-2 gene expression in TMJ of SD rats during prenatal and postnatal developmental period. **Results:** Apoptosis involved in different development periods of condylar cartilage, and the cells of apoptosis mainly located in the proliferative zone and the area between the prehypertrophic zone and the late hypertrophic zone. bcl-2 was expressed in chondrocytes throughout condylar cartilage with high levels in proliferative and prehypertrophic chondrocytes and obvious low levels in the late hypertrophic chondrocytes. Very few matured chondrocytes expressed bcl-2. **Conclusion:** Apoptosis regulated by bcl-2 plays an important role in prenatal and postnatal development of TMJ.

Key words: apoptosis bcl-2 gene in situ hybridization temporomandibular joint development

细胞凋亡与bcl-2基因在颞颌关节发育中的作用

(正文见第205页)

- 图1 胎鼠(E19)髁状突增殖层软骨细胞
PCD × 200
- 图2 胎鼠(E14)髁状突浅肥厚层软骨细
胞PCD × 200
- 图3 胎鼠(E14)髁状突近关节腔形成处
软骨细胞PCD明显 × 200



单层上皮细胞角蛋白 在口腔粘膜癌变过程中的表达

(正文见第208页)

- 图1 CK19表达于正常颊粘膜的基
底层 × 10
- 图2 CK19表达于中度上皮异常增
生的基底上层和基底层 × 20
- 图3 CK19表达于口腔癌癌细胞中
× 40

外加磁场对平阳霉素磁性微球 体内分布影响的实验研究

(正文见第218页)

不同酸处理根面的组织学比较

(正文见第230页)

- 图1 CT处理组, 术后3d根面见线状嗜
伊红无定形物(→), D 植入的牙片
HE × 150
- 图2 HA处理组, 术后3d牙片周围可见
大量多形核白细胞 HE × 150
- 图3 术后14~28d, TC处理组根面见不
伴吸收的骨性结合 HE × 150

- 图1 未加磁场时新西兰白兔体内放射性活度分布
H=4.76%, H+L=71.07%, K=4.40%, B=6.19%
- 图2 外加磁场后新西兰白兔体内放射性活度分布
H=67.69%, H+L=13.85%, K=4.1%, B=5.4%