

# 软骨细胞增殖与凋亡在人重组白细胞介素-1介导的颞下颌关节炎损伤中的意义

李松 杨春 罗应伟 沈丽宁 金岩

**摘要** 目的:探讨细胞增殖与凋亡在人重组白细胞介素-1介导的颞下颌关节炎损伤中的作用。方法:选用SD大鼠颞下颌关节腔内反复多次注射rhIL-1,造成炎症损伤,利用免疫组织化学染色及原位末端标记法,观察炎症损伤过程中髁突软骨细胞增殖及凋亡的变化。结果:注射后1~30d,实验侧髁突软骨增殖层PCNA阳性指数均较对照侧低,以1~7d最明显;实验侧髁突软骨细胞凋亡数较对照侧多,主要分布于软骨增殖层及前肥厚层中,以1~7d最明显,15d后凋亡细胞数明显减少,仅见个别凋亡细胞散在分布于软骨浅层。结论:rhIL-1关节内注射不仅使髁突软骨细胞增殖受抑制,而且细胞凋亡也可能是rhIL-1致关节损伤的途径之一,细胞增殖与凋亡协同参与了颞下颌关节炎损伤的病理过程。

**关键词** 增殖 凋亡 软骨细胞 炎症

## Roles of Proliferation and Apoptosis of Chondrocytes in Inflammatory Lesions Mediated by Recombinant Human Interleukin-1 on Condylar Cartilage of Temporomandibular Joint

Li Song, Yang Chun, Luo Yingwei, et al

Department of Stomatology, Kunming Medical College

Jin Yan

Stomatological College, the Fourth Military Medical University

### Abstract

**Objective:** The purpose of this study was to evaluate the role of cell proliferation and apoptosis in the inflammatory lesion mediated by recombinant human interleukin-1 on condylar cartilage of temporomandibular joint. **Methods:** The model of inflammatory lesion of temporomandibular joint in SD rats was established by intraarticular injection with recombinant human interleukin-1. The expressions of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and apoptosis in cartilage were examined by immunohistochemical staining and Tdt-mediated dUTP nick end labelling (TUNEL) during series time of after injection of recombinant human interleukin-1. **Results:** The immunostaining results showed that PCNA protein was expressed in proliferative zone of condylar cartilage, the positive index of PCNA decreased in proliferative zone after injection of recombinant human interleukin-1 1~30 days, and more obviously in 1~7 days. Apoptotic chondrocytes were mainly located in proliferative zone and the prehypertrophic zones, and the apoptotic chondrocytes increased in proliferative and prehypertrophic zones of condylar cartilage ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** These results suggest that suppression of proliferating cell nuclear antigen and high apoptosis of chondrocytes may play an important role in the inflammatory lesion or in the destructive process of temporomandibular joint osteoarthritis.

**Key words:** proliferation apoptosis chondrocyte inflammatory lesion

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是滑液关节的常见病,病理特点是进行性软骨丧失和软骨修复反应。

颞下颌关节(temporomandibular joint, TMJ)内紊乱常并发OA。TMJ OA的发生与IL-1、TNF- $\alpha$ 及IL-6等细胞因子有着密切的关系<sup>1</sup>,软骨细胞是受细胞因子作用的主要靶细胞,软骨细胞受到IL-1等细胞因子作用必然影响到软骨细胞的增殖、分化及凋亡

等细胞生命活动。国内外虽有 IL-1 介导的 TMJ 炎症损伤的病理实验,但有关 TMJ 炎症损伤过程中髁突软骨细胞增殖及凋亡的研究尚未见报道。本文通过微量、多次关节腔内注射人重组白细胞介素-1 (recombinant human interleubin-1 ,rhIL-1 ),造成 TMJ 炎症损伤,探讨软骨细胞增殖与凋亡在 IL-1 介导的 TMJ 炎症损伤、修复过程中的意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物与主要试剂

出生 20 d 的纯系 SD 大鼠 30 只(第四军医大学动物中心提供),rhIL-1 (1 μg/μ × 10<sup>4</sup>,北京邦定公司),增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 单克隆抗体 (Santa Cruz 公司,美国),SABC 试剂盒 (Vector 公司,美国),TUNEL (Tdt-mediated dUTP nick end labelling) 试剂盒 (Oncor 公司,美国)。

### 1.2 动物模型及标本制备

用乙醚吸入麻醉 SD 大鼠,经 75% 酒精皮肤消毒后,给一侧 TMJ 关节上腔内注射 rhIL-1 (用 pH 7.4,0.1 mol/L PBS 稀释为 1 μg/ml),每次 30 ng,隔天 1 次,共 3 次。对照侧不注射 rhIL-1。分别于注射后 1、3、7、15、30 d 脱颈处死大鼠 (每个时间点取 5 只),切取颞颌关节部(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% 多聚甲醛溶液中充分固定、脱钙,常规脱水、石蜡包埋。作矢状连续切片,厚度 5 μm,分别进行 HE 染色、免疫组织化学染色及 TUNEL 原位末端标记。

### 1.3 免疫组织化学检测 PCNA

免疫组织化学染色采用 SABC 法。步骤:石蜡切片脱蜡至水,经 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 封闭内源性过氧化物酶及枸橼酸缓冲液微波修复抗原 10 min 后,用 5% 正常羊血清封闭 30 min;滴加 PCNA 一抗(工作浓度 1:100)置于 4℃ 过夜,室温下复温 1 h 后滴加生物素化羊抗鼠 IgG 二抗,37℃ 反应 30 min;再加 ABC 复合物孵育 30 min,DAB 显色后,二甲苯透明、封片。用 PBS 代替一抗作为空白对照片。染色时所有的试剂统一配置,染色时间、温度及显色均严格标准化控制。

### 1.4 TUNEL 法检测凋亡细胞

TUNEL 染色:切片常规脱蜡至水,室温下 20 mg/L 的蛋白酶 K 消化 15 min;3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> PBS 溶液中处理 5 min 后,加 50 μl 的平衡液 1 min;再加含 TDT 酶反应液 15 μl,37℃ 反应 1.5 h 后用预热的中止反应液中中止反应;buffer1 漂洗 2 次 (15 min/次)后加 2% 正常羊血清孵育 30 min;滴加抗地高辛碱性磷酸酶抗体后置于湿盒中孵育 2 h;经 buffer1、buffer3 漂洗后,加新配制显色液 (NBT/BCIP 显色液,用 buffer3 配制,NBT 4.5 μl,BCIP 3.5 μl、左旋咪唑 0.24 mg/ml) 20 μl,暗处显色。中止显色后,梯度酒精脱水,二甲苯透明封片。

### 1.5 增殖指数及凋亡指数统计分析

在光学显微镜下,分别计数实验组及对照组各时间点软骨增殖层及前肥厚层中的 PCNA 阳性细胞数及凋亡细胞数。计算出各组的平均阳性细胞百分率和标准差,以阳性细胞百分率作为增殖及凋亡指数,分别进行配对 t 检验。

## 2 结果

### 2.1 HE 染色

停止注射后 1~3 d TMJ 上下腔内均可见炎性渗出物,以上腔明显,关节盘及关节凹滑膜下有炎性细胞浸润,滑膜细胞增生;15~30 d 炎性渗出物消失,可见髁突软骨表面纤维层断裂,髁突软骨凹凸不平,软骨细胞簇状增生。正常关节腔内无炎性渗出物,关节盘、髁突及关节凹表面光滑,软骨各层清楚。

### 2.2 免疫组织化学染色

PCNA 阳性细胞为胞核着棕黄色。实验侧:注射后 1~3 d,髁突软骨增殖层 PCNA 阳性软骨细胞数减少(图 1),7 d 时 PCNA 表达进一步减弱,肥厚层中未见 PCNA 阳性软骨细胞,对照侧各时间 PCNA 无明显变化(图 2)。实验侧 1、3、7、15、30 d PCNA 指数与对照侧比较差异有显著性(表 1)。

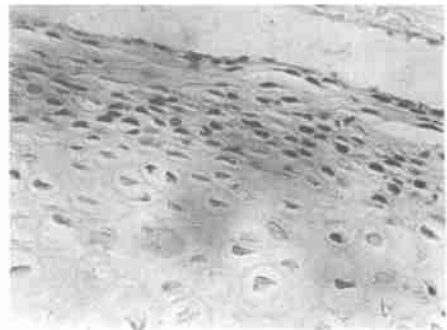


图 1 注射后 3 d 髁突软骨增殖层 PCNA 阳性软骨细胞数减少 SABC × 300

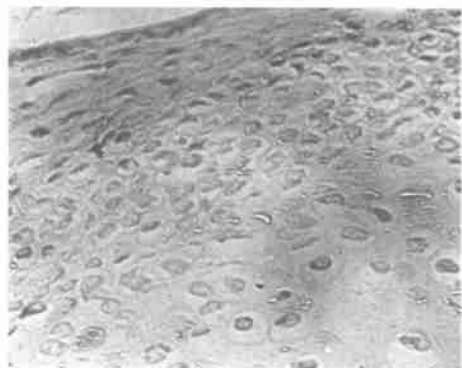


图 2 注射后 3 d 对照侧髁突软骨 PCNA 表达 SABC × 300

### 2.3 TUNEL 染色

阳性细胞为细胞核着紫蓝色。实验侧:注射后 1~7d, 髌突软骨细胞凋亡数较正常对照侧增多,主要分布于软骨增殖层及前肥厚层(图 3);肥厚层中凋亡细胞较少;15~30 d 软骨增殖层及前肥厚层中凋亡细胞数明显减少(图 4),对照侧各时间凋亡率无明显变化。

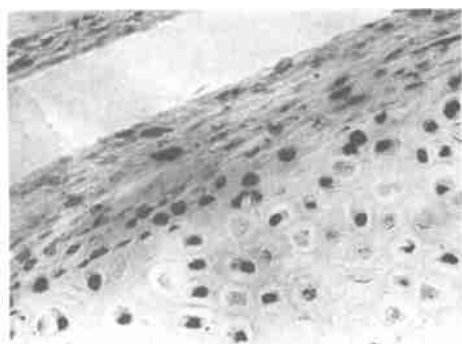


图3 注射后3d髌突软骨细胞凋亡增多,分布于软骨增殖层及前肥厚层 TUNEL ×300



图4 注射后3d对照侧未见明显髌突软骨凋亡细胞 TUNEL ×300

实验侧 1、3、7、15、30 d 各时间点凋亡指数与对照侧比较差异有显著性(表 1)。

表 1 rhIL-1 注射后不同时间点髌突软骨细胞增殖及凋亡的变化( $\bar{x} \pm s$ , %)

组别	n	PCNA	凋亡
对照组	5	10.2 ±2.2	3.4 ±1.9
1 d	5	5.1 ±3.1 <sup>b</sup>	25.3 ±3.2 <sup>a</sup>
3 d	5	4.6 ±2.2 <sup>b</sup>	23.6 ±3.2 <sup>a</sup>
7 d	5	4.2 ±3.1 <sup>b</sup>	19.5 ±3.6 <sup>a</sup>
15 d	5	5.8 ±2.4 <sup>b</sup>	7.2 ±2.8 <sup>a</sup>
30 d	5	6.7 ±3.0 <sup>b</sup>	7.2 ±2.7 <sup>a</sup>

a  $P < 0.01$ , b  $P < 0.01$  与对照组相比

### 3 讨 论

已有研究证实 IL-1 注射于动物的滑液关节,可诱发类似 OA 样病变<sup>2,3</sup>。本研究给大鼠 TMJ 关

节腔内注射 rhIL-1 后 1~3 d TMJ 关节腔内开始有炎性渗出物;7~15 d 炎症渗出吸收,继而出现滑膜细胞增生,髌突软骨表面纤维层断裂,髌突软骨凹凸不平,软骨细胞簇状增生等病理改变,进一步证明 IL-1 是 TMJ 器质性损害的一种重要介质,也说明用 rhIL-1 诱导 TMJ 炎症损伤模型的可靠性。

PCNA 是 DNA 聚合酶 的辅助因子,只出现在增殖状态的细胞中,为细胞增殖所必须的成分之一,其表达随细胞周期变化,PCNA 发生磷酸化后与 DNA 合成部位结合,激活 DNA 复制因子,促使细胞增殖。由于 PCNA 存在于增殖细胞核内,而静止期细胞缺乏,故 PCNA 阳性着色细胞多少可反映出细胞增殖的状况<sup>4</sup>。本研究结果表明,TMJ 关节腔内注射 rhIL-1,使髌突软骨增殖层 PCNA 阳性细胞减少、表达减弱,而且在观察期间内软骨细胞 PCNA 阳性细胞率一直较对照侧低,恢复较慢。由于增殖层是软骨不断生长的中心,此层软骨细胞具有较强的增殖能力,软骨细胞不断增殖可使深层软骨细胞得到补充。PCNA 阳性细胞数减少,说明 rhIL-1 作用于软骨后可使软骨细胞的增殖受到抑制,软骨自身修复能力下降。

细胞凋亡是在一定生理和病理条件下细胞的一种死亡方式,它与细胞增殖、分化一样是生命过程中不可缺少的。细胞凋亡不仅在胚胎发育、器官形成及肿瘤发生中发挥作用,而且与退行性改变等疾病的发生及病理过程有关<sup>5</sup>。OA 作为滑液关节常见的退行性疾病,其病理改变一方面可见软骨细胞减少,大量软骨细胞丢失;另一方面也可见部分软骨细胞增生形成簇等修复反应,对出现上述病理变化的机理还不清楚。据 Blanco 等<sup>6</sup> 对 16 例 OA 患者关节软骨的细胞凋亡观察,软骨细胞中有典型的细胞凋亡,凋亡细胞主要分布于软骨的表层和中层,OA 软骨中凋亡细胞的比例高达 51%,明显高于正常者的 11%,提示细胞凋亡可能参与了 OA 的病理过程。Hashimoto 等<sup>7</sup> 采用兔膝关节盘前带十字形横切,造成 OA 样病变动物模型,也观察到了 OA 关节软骨的明显细胞凋亡。本研究的实验侧髌突软骨细胞凋亡较对照侧明显,其主要分布在软骨增殖层及前肥厚层,与 Blanco 及 Hashimoto 报道的研究结果相似。早期损伤(1~7d)凋亡明显,以后凋

(下转第 106 页)

损伤修复过程中发挥了重要作用。在牙髓受到损伤发生修复时,牙髓内未分化间充质细胞可能受到特定的分子信号刺激后,开始发生分化,向受损部位移行,取代损伤的原代成牙本质细胞,分化为成牙本质细胞样细胞<sup>9</sup>。本研究结果表明,在刺激15 d后的牙髓内, FN 呈网状分布,提示 FN 可能参与了新分化的成牙本质细胞向受损部位的移行。FN 在修复性牙本质和牙髓之间的界面强阳性,提示成牙本质细胞样细胞的分化、附着可能需要 FN 诱导。

术后 15 d,修复性牙本质已形成,但 FN 免疫活性不明显。在术后 30 d 的修复性牙本质基质中,可观察到强阳性的 FN。这个结果提示, FN 的来源更可能由新分化的成牙本质细胞分泌。对牙本质形成过程的研究已证明, FN 是发育中的成牙本质细胞较先合成的细胞外基质,但并不直接参与牙本质的生物矿化<sup>10</sup>。由于 FN 与胶原纤维有很强的结合能力,是否在修复性牙本质矿化过程中具有某种协同作用,尚待研究。

**参考文献**

- 1 Hynes R. Molecular biology of fibronectin. *Ann Rev Biol*, 1985, 1(1) :67 ~ 90
- 2 Thesleff I, Barrach HJ, Foldart JM, et al. Changes in the distribution of Type IV collagen, laminin, proteoglycan, and fibronectin during mouse tooth development. *Dev Biol*, 1981, 81(1) :182

(上接第 97 页)

亡率逐渐降低,但至 30 d 时实验侧凋亡率仍较对照侧高。此特点说明关节腔内注射 rhIL-1 可使髌突软骨细胞凋亡增加,软骨细胞凋亡可能参与 OA 的病理损害过程;而且提示软骨细胞凋亡可能是 OA 髌突软骨持续性破坏的原因之一。由于髌突软骨增殖层是软骨主要增殖区,此区的软骨细胞增殖与凋亡的不均衡,可导致表层软骨细胞不均匀的分布,这可能与 OA 表层关节软骨部分区域细胞增生簇状,另一部分区域软骨细胞减少或缺失有关。

**参考文献**

- 1 Kubota E, Kubota T, Matsumoto J. Synovial fluid cytokines and proteinases as markers of temporomandibular joint disease. *J Oral Maxillofac Surg*, 1998, 56(2) :192 ~ 198
- 2 Chandrasekhar S, Harvey AK, Hruby PS, et al. Arthritis induced by interleukin-1 is dependent on the site and frequency of intraarticular injection. *Clin Immunol Immunopathol*, 1990, 55

~ 192

- 3 Linde A, Johanson S, Jonsson R, et al. Localization of fibronectin during dentinogenesis in rat incisor. *Arch Oral Biol*, 1982, 27(12) :1069 ~ 1073
- 4 Lesot H, Kubler MD, Fausser JL, et al. A 165 kDa membrane antigen mediating fibronectin - vinculin interaction is involved in murine odontoblast differentiation. *Differentiation*, 1990, 44(1) : 25 ~ 35
- 5 Yoshida N, Yoshida K, Nakamura H, et al. Immunoelectron-microscopic study of the localization of fibronectin in the odontoblast layer of human teeth. *Arch Oral Biol*, 1995, 40(2) :83 ~ 89
- 6 Magloire H, Joffre A, Hartmann DJ. Localization and synthesis of type III collagen and fibronectin in human reparative dentine: Immunoperoxidase and immunogold staining. *Histochemistry*, 1988, 88(2) :141 ~ 149
- 7 Tziafas D, Panagiotakopoulos N, Komnenou A. Immunolocalization of fibronectin during the early response of dog dental pulp to demineralized dentine or calcium hydroxide-containing cement. *Arch Oral Biol*, 1995, 40(1) :23 ~ 31
- 8 Yoshida K, Yoshida N, Nakamura H, et al. Immunolocalization of fibronectin during reparative dentinogenesis in human teeth after pulp capping with calcium hydroxide. *J Dent Res*, 1996, 75(8) :1590 ~ 1597
- 9 樊明文,李成章,凌均荣,等. 牙本质非胶原蛋白诱导修复性牙本质形成的实验研究. *口腔医学纵横*, 1996, 12(1) : 67
- 10 Ruch JV. Tooth crown morphogenesis and cytodifferentiations: Candid question and critical comments. *Connect Tissue Res*, 1995, 32(1) :1 ~ 8

(2000-05-18 收稿,2001-09-03 修回)

(本文编辑 王 晴)

(4) :382 ~ 400

- 3 Mehraban F, Tindal MH, Proffitt MM, et al. Temporal pattern of cysteine endopeptidase (cathepsin B) expression in cartilage and synovium from rabbit knees with experimental osteoarthritis: gene expression in chondrocytes in response to interleukin-1 and matrix depletion. *Ann Rheum Dis*, 1997, 56(2) :108 ~ 115
- 4 Iwaki A, Jingushi S, Oda Y, et al. Localization and quantification of proliferating cells during rat fracture repair: detection of proliferating cell nuclear antigen by immunohistochemistry. *J Bone Miner Res*, 1997, 12(1) :96 ~ 102
- 5 Hashimoto S, Setareh M, Ochs RL, et al. Fas/Fas ligand expression and induction of apoptosis in chondrocytes. *Arthritis Rheum*, 1997, 40(10) :1749 ~ 1755
- 6 Blanco FJ, Guitian R, Vazquez Martul E, et al. Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis. A possible pathway for osteoarthritis pathology. *Arthritis Rheum*, 1998, 41(2) :284 ~ 289
- 7 Hashimoto H, Tanaka M, Suda T, et al. Soluble Fas ligand in the joints of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 1998, 41(4) :657 ~ 662

(2000-12-21 收稿)

(本文编辑 王 晴)