

功能矫形前伸下颌后大鼠翼外肌胰岛素分布的免疫组织化学研究

黄宁 罗颂椒 王昕

摘要 目的:研究功能矫形治疗后翼外肌内胰岛素的分布规律和定位。方法:采用免疫组化 ABC 法,对青春生长期雄性 SD 大鼠功能矫形前伸下颌后翼外肌内胰岛素的分布和规律进行定位和半定量研究。结果:翼外肌内胰岛素定位于肌细胞膜上;功能矫形前伸下颌后,大鼠翼外肌内胰岛素的分布增加。结论:胰岛素在功能矫形前伸下颌后翼外肌的适应性改建中有重要作用。

关键词 功能矫形 翼外肌 胰岛素 免疫组织化学

An Immunohistochemical Study of Distribution of Insulin in Lateral Pterygoid Muscle after Functional Mandibular Protrusion in Rats

Huang Ning, Luo Songjiao, Wang Xin

The College of Stomatology, West China University of Medical Sciences

Abstract

Objective: The aim of this study is to investigate the effects of insulin on the lateral pterygoid muscle of growing rats after the functional mandibular protrusion. **Methods:** An immunohistochemical (the ABC method) method was used to detect the location and distribution of insulin in the lateral pterygoid muscle of rats. **Results:** 1. Insulin located in the cell membrane of the lateral pterygoid muscle. 2. The distribution of insulin in the lateral pterygoid muscle of rats was enhanced after the functional mandibular protrusion. **Conclusion:** Insulin may play an important role in adaptive remodeling of the lateral pterygoid muscle after the treatment of functional mandibular protrusion.

Key words: orthopedics lateral pterygoid muscle insulin rat immunohistochemical

功能矫形前伸下颌后,髁突和翼外肌的功能和结构发生了适应性改建^{1~3}。许多内源性激素和生长因子,如雌激素、甲状旁腺素、胰岛素样生长因子(IGF)等在其生长改建中的作用已有较多研究,为功能矫形治疗提供了理论实验基础。研究发现^{4,5}功能矫形前伸下颌后,青春大鼠髁突和翼外肌内胰岛素含量增加,且翼外肌内胰岛素的含量变化具有规律性。这说明胰岛素在翼外肌的适应性改建中可能发挥重要作用。然而,胰岛素在翼外肌内的分布和定位,目前尚未见报道。本文为功能矫形系列研究的一部分,采用免疫组织化学方法,对青春生长期雄性 SD 大鼠功能矫形前伸下颌后翼外肌胰岛素的分布和规律进行定位、定性和半

定量分析,探讨胰岛素在翼外肌适应性改建中的作用,丰富功能矫形治疗的理论基础。

1 材料和方法

1.1 实验设计

选用 5 周龄、体重 90g 左右的雄性 SD 大鼠 32 只,编号,查随机数字表,随机等量地分为实验组和对照组。实验组大鼠戴自制活动上颌斜面导板式功能矫治器,引导下颌前伸,每日戴 10~12 h。对照组大鼠不戴矫治器。两组动物均在同一条件下饲养,分别于实验 3 d、1 周、2 周、3 周断颈处死,立即取下右侧翼外肌,用冰 0.01% PBS 缓冲液洗净,置 10% 中性福尔马林固定液中固定,脱水,常规石蜡切片,进行组织学(HE)和免疫组织化学(ABC)分析。

1.2 实验方法

1.2.1 主要试剂及仪器 一抗:小鼠抗胰岛素单克隆抗体(北京中山公司),二抗:豚鼠抗小鼠生物素标记 IgG,ABC 复

合物(北京中山公司),冰箱、恒温箱等。

1.2.2 翼外肌胰岛素免疫组化染色(ABC法) 烘片、二甲苯脱蜡,酒精梯度脱水,0.3%过氧化氢封闭内源性过氧化酶,PBS洗,0.1%胰酶消化,2%羊血清孵育10 min,不洗。直接加一抗,37℃湿盒内孵育,4℃冰箱过夜,再分别加二抗和ABC复合物。新鲜配制的DAB(0.5mg/ml)液,光镜下控制显色,自来水终止显色反应,苏木素复染。自来水洗,酸酒精分化,酒精梯度脱水,二甲苯透明,封片。

1.2.3 阳性对照和阴性对照 阳性对照采用正常胰岛组织石蜡切片;阴性对照采用同一翼外肌石蜡切片,以PBS代替一抗操作。阴性对照在各次实验中均呈阴性结果。

1.2.4 翼外肌胰岛素的阳性细胞标准 细胞形态完整,结构明确,背景清晰,棕黄色颗粒特异地定位于胞膜上,着色水平明显高于背景平均水平。

1.2.5 阳性率的半定量计数法 横切面时,阳性细胞数占连续切片的HE染色切片内细胞数的百分比,为阳性率。

2 结 果

2.1 翼外肌的胰岛素免疫组化观察

2.1.1 对照组 胰岛素阳性染色颗粒定位于肌细胞膜上,棕黄色,呈点、线、片状不均匀分布。3 d组有阳性染色出现,1周、2周阳性染色细胞数增多,着色增强,3周时下降(图1)。

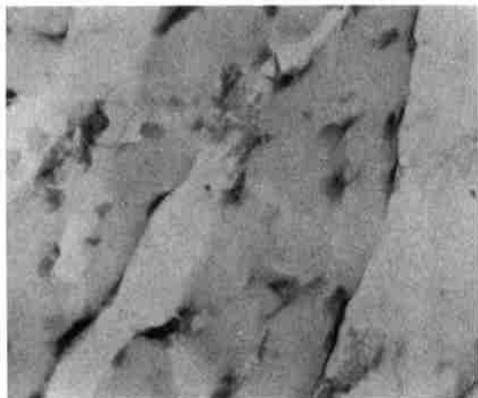


图1 对照2周组大鼠翼外肌内胰岛素的分布,棕黄色沉淀物为阳性染色 ABC ×400

2.1.2 实验组 胰岛素阳性染色同样定位于肌细胞膜上,阳性染色呈点、线、片、团状。实验组阳性染色变化与对照组时段有类似变化,但实验组在各个时段阳性染色细胞数均多于对照组(图2)。

2.2 翼外肌胰岛素阳性染色半定量计数

两组SD大鼠翼外肌胰岛素阳性染色细胞占细胞总数的百分比见表1。

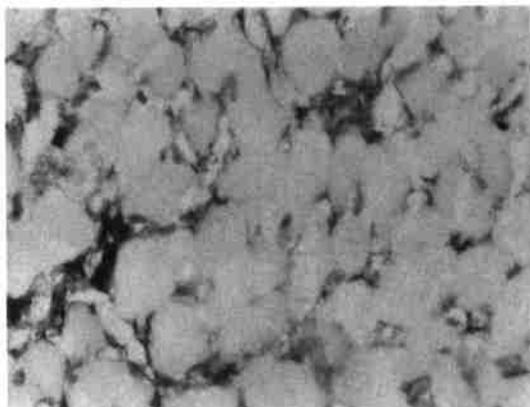


图2 实验2周组大鼠翼外肌内胰岛素的分布,棕黄色沉淀物为阳性染色 ABC ×400

表1 两组SD大鼠翼外肌内胰岛素细胞染色阳性率(%)

实验时间	实验组阳性率	对照组阳性率
3 d	31	26
1周	85	80
2周	95	88
3周	70	65

3 讨 论

功能矫形前伸下颌后,翼外肌的功能和结构发生了适应性改建。在影响翼外肌生长改建的许多因素中,胰岛素占有重要地位。它可促进肌肉糖、蛋白质代谢,促进骨骼肌纤维增殖和肥大。功能矫形时翼外肌内胰岛素含量在大鼠青春生长初期、矫形治疗开始时较少;高峰期增加;随生长发育基本完成,矫形治疗结束,胰岛素含量逐渐降低至一般水平。然而,青春生长期大鼠功能矫形前伸下颌后翼外肌内胰岛素的分布及其在细胞上定位的研究,目前国内外尚未见报道。本文采用免疫组化ABC法研究发现,对照组(不戴功能矫治器)大鼠在青春期生长过程中翼外肌内胰岛素的分布及定位有规律性。胰岛素阳性染色3 d组出现,1周、2周组阳性染色细胞数逐渐增多达高峰,3周时开始下降。这可能与大鼠3 d组时,翼外肌功能活动较弱,胰岛素分布较少有关;1周、2周组大鼠翼外肌功能活动增加,所需能量增加,因而翼外肌内胰岛素分布增多;3周组(此时大鼠已8周龄),胰岛素分布减少,可能与大鼠青春生长期生长基本完成,翼外肌适应下颌运动有关。

(下转第154页)

用。IL-6能显著促进破骨细胞的形成,影响破骨细胞前体的募集和诱导成熟破骨细胞的增殖与分化。同时,活化的破骨细胞本身又能产生IL-6^{3,4}。

关于IL-6促进骨吸收的机理,学者们^{5,6}认为是通过与破骨细胞膜上表达的特异性受体结合来调控的。指出破骨细胞表面存在特异性IL-6受体(IL-6R),此受体具有酪氨酸蛋白激酶的活性。当IL-6与IL-6R结合后,激活受体本身的酪氨酸蛋白激酶,并依赖此激酶的活性完成信号的跨膜传递,使细胞内靶蛋白酪氨酸残基磷酸化,从而引起破骨细胞反应。

综上所述,咬合力丧失诱导了牙周膜成纤维细胞和牙槽骨成骨细胞表达IL-6 mRNA明显增加。它一方面参与了牙周膜的降解,调节牙周膜的改建。另一方面IL-6明显促进了破骨细胞的形成和活化,而活化的破骨细胞又能分泌IL-6、IL-1和TNF,促进更多的破骨细胞形成。IL-6通过自分泌和旁分泌的方式参与牙槽骨的吸收,诱发牙槽骨的改建。

(上接第143页)

实验组(戴功能矫治器)大鼠功能矫形前伸下颌后,引起翼外肌活动增强。翼外肌内胰岛素阳性染色计数除具有对照组的一般分布规律外,且在各个实验时段均高于对照组。提示实验组大鼠翼外肌内胰岛素的增加,除与青春期生长发育有关外,矫形治疗这一施加因素也发挥了重要作用。翼外肌内胰岛素的增加,可能通过促进葡萄糖跨膜转运进入肌细胞⁶,促进葡萄糖的氧化利用产生高能ATP,增加糖元合成,为翼外肌功能活动增强、耗能增加提供有力保证。胰岛素还可加强蛋白质合成,促进肌纤维肥大,为翼外肌功能矫形后的适应性改建奠定物质基础。功能矫形前伸下颌后,大鼠翼外肌内胰岛素分布的增加,与翼外肌的功能和结构改建有密切关系。

此外,实验组和对照组大鼠翼外肌内胰岛素阳性染色均定位肌细胞膜上。由于组织中胰岛素只能和胰岛素受体产生特异性结合,说明翼外肌细胞膜上存在胰岛素受体。至于胰岛素与何种类型胰岛素受体结合,如何进一步引起细胞内的一系列反

参考文献

- 1 Shimizu N, Ogura N, Yamaguchi M, et al. Stimulation by interleukin-1 of interleukin-6 production by human periodontal ligament cells. Arch Oral Biol, 1992, 37(9): 743 ~ 748
- 2 袁林, 赵云凤. 咬合力与大鼠牙周组织改建关系研究中动物模型的建立. 实用口腔医学杂志, 2000, 16(3): 199 ~ 201
- 3 Littlewood AJ, Russell J, Harvey GR, et al. The modulation of the expression of IL-6 and its receptor in human osteoblasts in vitro. Endocrinology, 1991, 129(3): 1513 ~ 1520
- 4 Ishimi Y, Miyaura C, Jin CH. IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. J Immunol, 1990, 145(10): 3297 ~ 3303
- 5 O'Keefe RJ, Teot LA, Singh D, et al. Osteoblasts constitutively express regulators of bone resorption: an immunohistochemical and in situ hybridization study. Lab Invest, 1997, 76(4): 457 ~ 465
- 6 Hoyland JA, Freemont AT, Sharpe PT. Interleukin-6, IL-6 receptor and IL-6 nuclear factor gene expression in Paget's disease. J Bone Miner Res, 1994, 9(1): 75 ~ 80

(1999-10-15 收稿)

(本文编辑 王 晴)

应,最终发挥胰岛素对翼外肌的作用,尚需进一步研究。

参考文献

- 1 McNamara JA. Functional adaptations in the temporomandibular joint. Dent Clin North Am, 1975, 19(3): 457 ~ 461
- 2 Sessle BJ. Effect of functional appliances on jaw muscle activity. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 1990, 98(2): 222 ~ 234
- 3 王昕, 罗颂椒, 周秀坤, 等. 功能矫形前伸下颌后幼年大鼠下颌前伸肌的组织化学研究. 华西口腔医学杂志, 1992, 10(3): 220 ~ 223
- 4 赖文莉, 赵美英, 罗颂椒. 功能矫形大鼠下颌前伸后髁突胰岛素分布规律的研究. 中华口腔医学杂志, 1996, 31(2): 91 ~ 94
- 5 黄宁. 功能矫形前伸下颌后大鼠翼外肌胰岛素含量和分布变化的实验研究. 华西医科大学研究生学位论文, 1997: 17 ~ 25
- 6 Branard RJ, Youngren JF. Regulation of glucose transport in skeletal muscle. FASEB J, 1992, 6(14): 3238 ~ 3248

(1999-12-16 收稿, 2000-12-17 修回)

(本文编辑 王 晴)