

· 颞下颌关节与颌骨研究 ·

Sonic hedgehog 参与人胰岛素样生长因子-1 信号通路促使下颌骨髁突过度生长的实验研究

陈宇翔^{1,2#} 黄群^{2#} 张武阳¹ 马秦^{1*} 龙星^{3*}

(1. 军事口腔医学国家重点实验室,解放军第四军医大学(空军军医大学)口腔

医院颌面外科 陕西 西安 710032;2. 广东省妇幼保健院口腔医学中心 广东 广州 511400;

3. 口腔生物医学教育部重点实验室,武汉大学口腔医院颌面外科 湖北 武汉 430079)

[摘要] 目的:通过活体动物实验观察人胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor, IGF-1)与 Sonic hedgehog(xinh) (Shh)介导的信号通路促进了髁突过度生长的作用。方法:制备 IGF-1 高表达表型转基因小鼠模型。将转基因鼠随机分为 5 组:Cyclopamine 刺激组;NVP-AEW541 刺激组;IGF-1 刺激组;Cyclopamine+ IGF-1 刺激组;生理盐水刺激组;空白对照,每组 3 只。随机选取一侧关节腔自 31 d 起隔天连续进行上述药物注射,共 14 d,注射结束后收获实验侧髁突,固定,比较两侧髁突大小,分析差异性。结果:Cyclopamine 刺激组及生理盐水刺激组实验侧与对照侧髁突大小比较差异无统计学意义。NVP-AEW541 刺激组、IGF-1 刺激组以及 Cyclopamine+ IGF-1 刺激组实验侧髁突小于对照侧髁突($P < 0.05$)。结论:IGF-1 介导的信号通路促进了髁突肥大髁突的过度生长。

[关键词] 髁突肥大 音猬因子 人胰岛素样生长因子-1

[文献标识码] A **[文章编号]** 1671-7651(2018)08-0866-04

[doi] 10.13701/j.cnki.kqxyj.2018.08.016

Animal Experiment on Cooperation between Shh and IGF-1 in Promoting Mandibular Cartilage Overgrowth. CHEN Yu-xiang^{1,2#}, HUANG Qun^{2#}, ZHANG Wu-yang¹, MA Qin^{1*}, LONG Xing^{3*}. 1. State Key Laboratory of Military Stomatology, School of Stomatology, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China; 2. Stomatology Center, Guangdong Women and Children Hospital, Guangzhou 511400, China; 3. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Stomatology, Wuhan University, Wuhan 430079, China.

[Abstract] **Objective:** To investigate the combination effect of Shh and IGF-1 in promoting the mandible condylar cartilage overgrowth. **Methods:** Transgenic rats with IGF-1-over expression in condylar cartilage were constructed to allow the local administration of IGF-1 and its specific inhibitor NVP-AEW541, and Cyclopamine, the specific inhibitor of Shh. All rats were divided into five experiment groups by different stimulating additions: (1) Cyclopamine; (2) NVP-AEW541; (3) IGF-1; (4) Cyclopamine+ IGF-1; (5) physiological saline. Unilateral condyle was randomly chosen to make the intra-capsule injection, and then its size was compared to the control condyle. **Results:** Compared with control condyle, the sizes of the condyle which were local injected with NVP-AEW541, IGF-1, and Cyclopamine+ IGF-1 were significantly smaller ($P < 0.05$). There was no difference on the size of the condyle between cyclopamine and physiological saline stimulation groups ($P < 0.05$). **Conclusion:** IGF-1 promotes human TMJ cartilage overgrowth in the developing process of condylar hyperplasia.

[Key words] Condylar hyperplasia Sonic hedgehog Insulin-like growth factor-1

基金项目 国家自然科学基金青年项目(编号:81400481)

作者简介 陈宇翔(1982~),男,主治医师,博士,主要从事颞颌关节疾病的临床与基础研究。

黄群(1967~),男,主任医师,博士,主要从事颞颌关节疾病及唇腭裂的临床与基础研究。

* **通讯作者** 马秦, E-mail: qinma@fmmu.edu.cn

龙星, E-mail: longxing@whu.edu.cn

为共同第一作者

髁突肥大(condylar hyperplasia)是一种好发于青少年的单侧髁突过度生长性疾病^[1],其生长具有自限性,可引发面部偏斜和咬合紊乱等症状^[2],其发病机制未明。患侧髁突的生长活跃是其过度生长的主要原因^[3]。在本课题组前期研究中,髁突肥大软骨高表达人胰岛素样生长因子-1(insulin-like

表 1 IGF-1 高表达转基因鼠的注射期内相应的体重变化

Table 1 The variety of rats' weight during the injection

(单位:g)

鼠龄/d	生理盐水	NVP-AEW541	人胰岛素样生长因子-1(IGF-1)	环杷明(CYCL OPAMINE)	CYCLOCYCLO +IGF-1	正常雄性	正常雌性
31	19.0	22.7	22.2	20.4	22.8		
33	19.2	22.9	22.7	20.7	23.1	24.7	20.4
35	20.0	23.6	23.1	20.7	23.4		
37	20.3	23.8	23.8	21.4	23.8		
39	20.8	24.1	24.6	21.7	24.9		
41	21.7	23.9	25.4	21.6	25.7	25.3	20.7
43	21.8	24.7	25.5	21.8	25.9		
45	21.7	25.7	24.9	21.3	25.9		

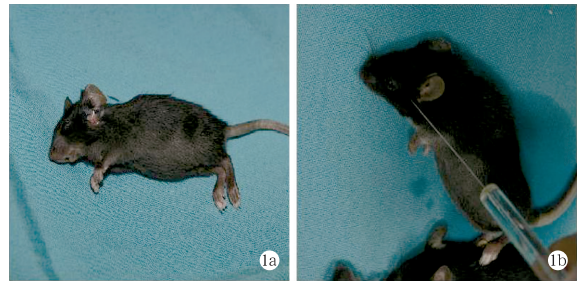
growth factor, IGF-1) 及其受体^[4], 同时, Sonic hedgehog (Shh) 也在患侧髌突高表达^[5], 而局部髌突浓聚的 IGF-1 促进了髌突肥大软骨细胞的高增殖^[6], Shh 信号通路在上述过程中抑制髌突软骨细胞凋亡^[5]。因此, 本研究拟通过动物实验观察验证存在串话机制的 IGF-1 与 Shh 信号促进活体髌突的过度生长, 论证上述信号通路在髌突肥大病理发生发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 动物模型的制备 本研究由第四军医大学口腔医院动物实验伦理委员会审核批准。转基因小鼠由赛业(广州)生物科技有限公司制作并提供, 具体流程为: 构建 IGF-1 转基因载体(软骨特异性启动因子-IGF-1 DNA-内部核糖体进入位点(internal ribosome entry site, IRES)-增强绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP); 质粒大提及线性化约 1 周; 再于鼠受精卵发育前期(即 2 个原核时期: 卵母细胞和精子)将外源 DNA 通过显微注射的方法注射到代孕母鼠体内受精卵的原核内, 注射 DNA 整合到小鼠受精卵的基因组中, 19d 后子鼠出生, 1 周后行鼠软骨 IGF-1 的 DNA 鉴定及表型确定。获得 IGF-1 高表达表型转基因小鼠 F0, 与野生型鼠进行杂交, 获取 F1 代进行鉴定, 获取获得 IGF-1 高表达表型转基因小鼠共 20 只(图 1a, 表 1)。

1.2 分组 将转基因鼠随机分为 5 组: 1) Cyclo-pamine 刺激组: 阻断 Shh 信号通路, 反向验证 Shh 在软骨过度生长中的作用, 注射浓度为 10 mg/kg; 2) NVP-AEW541 刺激组: 阻断 IGF-1 信号通路, 反向验证 IGF-1 在软骨过度生长中的作用; 3) IGF-1 刺激组: 增强 IGF-1 通路, 正向验证 IGF-1 在软骨过度生长中的作用, 注射浓度为 100 μg/L; 4) Cyclo-pamine+IGF-1 刺激组: 先注射

Cyclo-pamine, 30min 后在注射 IGF-1, 验证 Shh 与 IGF-1 这两条通路的上下游关系; 5) 生理盐水刺激组: 空白对照, 每组 3 只。由第四军医大学动物实验中心饲养。



1a: IGF-1 高表达转基因鼠; 1b: 关节腔内注射

图 1 IGF-1 高表达转基因鼠的关节腔内注射

Fig. 1 Local administration of IGF-1 in over-expressed transgenic rats.

1.3 注射方法 每个实验组随机选转基因鼠各 3 只, 从第 31 天起, 随机选取一侧关节腔为实验侧, 另一侧为个体对照侧, 以 15 μL 微量注射针, 每隔 1 d 分别往单侧的关节腔内注入刺激因子, 比照体重, 直至鼠体重稳定不再有明显增长为止。处死实验鼠, 小心剥离软组织, 收获下颌骨, 甲醛固定。

1.4 髌突生长情况的判定与比较 参考文献[7]研究方法, 通过图像分析软件 Quick Measuring, 调整比例尺, 测量同一下颌骨实验侧与对照侧髌突的前后径、颈部上端与髌突顶部的各自最长距离(图 2), 比较两组前后径的距离×颈部上端与髌突顶部距离的积, 取平均值, 进行比较。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 13.0 软件对数据进行统计分析。首先用 W-test (Shapiro-Wilk test) 法检验数据是否服从正态分布, 若服从正态分布, 两个独立样本间数据的比较则采用 t 检验; 若不服从正态分布, 两个独立样本间数据的比较则采用 ManneWhitney 非参数检验, 检验水准 α=0.05。

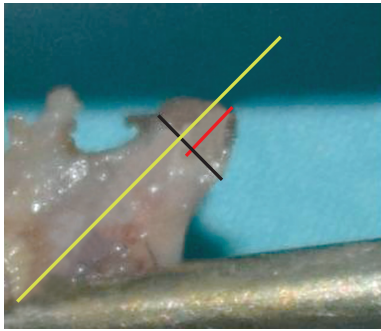
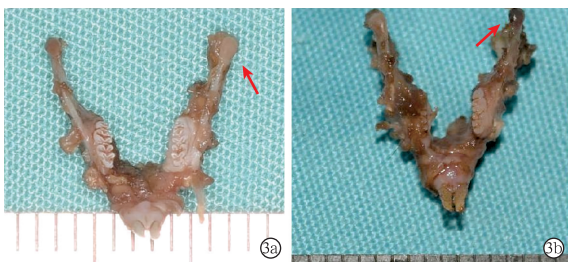


图2 鼠髁突样本大小的测量方法

Fig. 2 The method to measure the size of lateral condyle.

2 结果

所有实验组自出生后第 31 天起开始实验,经动态测量体重,基本于第 41 天起体重增长趋于平稳或无增长,除 Cyclopamine + IGF-1 刺激组中途有 1 只实验鼠于实验过程中死亡外,所有实验均于鼠出生后第 46 天结束,历时 14 d,每只实验用鼠共计接受药物注射 9 次。实验侧髁突表现了明显的过生长或生长抑制表现(图 3)。Cyclopamine 刺激组:实验侧髁突大小为 $(2.84 \pm 0.07) \text{ mm}^2$,对照侧髁突大小为 $(3.16 \pm 0.43) \text{ mm}^2$,两者比较差异无统计学意义($P=0.358$);NVP-AEW541 刺激组:实验侧髁突 $[(2.42 \pm 0.10) \text{ mm}^2]$ 小于对照侧髁突 $[(2.91 \pm 0.19) \text{ mm}^2]$, $P=0.033$;IGF-1 刺激组:实验侧髁突 $[(3.89 \pm 0.24) \text{ mm}^2]$ 大于对照侧髁突 $[(2.96 \pm 0.20) \text{ mm}^2]$, $P=0.015$;Cyclopamine+IGF-1 刺激组:实验侧髁突 $[(4.42 \pm 0.17) \text{ mm}^2]$ 显著大于对照侧髁突 $[(2.74 \pm 0.05) \text{ mm}^2]$, $P=0.000$;生理盐水刺激组:实验侧 $[(3.22 \pm 0.19) \text{ mm}^2]$ 与对照侧 $[(3.62 \pm 0.46) \text{ mm}^2]$ 髁突大小比较差异无统计学意义($P=0.332$)。



3a: 髁突过度生长;3b: 髁突生长抑制

图3 髁突的过生长或生长抑制表现

Fig. 3 Overgrowth or growth inhibitory of condyle.

3 讨论

本研究通过动物实验证实了 Shh 及 IGF-1 在髁突过生长中的作用。在本课题组前期的研究发现了髁突肥大患侧髁突的 IGF-1 及其受体的以自

分泌的形式于局部高度浓集,也通过免疫组化染色证实了 Shh 信号通路在髁突肥大软骨中异常高表达。因此,尽管不能等同于髁突肥大的动物模型,但通过制作转基因鼠 IGF-1 过表达模型,可模拟患侧髁突的 IGF-1 及其受体高表达的活体环境。小鼠为杂食性动物,其颞颌关节结构与人类有较大的相似性,且其青春发育期较短,选择其实验动物,有利于动态观察干预条件下的髁突生长变化。选择鼠产后第 31 天开始,以体重增加变化直至基本稳定为参照,作为判断鼠的青春发育期的开始以及结束,适时调整干预刺激的剂量以及时间和次数,可模拟髁突肥大发生于青春期内病理性生长进程。

本实验结果显示,通过关节腔局部注射生理盐水,其注射侧与对照侧髁突大小比较差异无统计学意义,表明关节腔注射刺激本身并不形成髁突生长的干扰因素。而单侧髁突局部增加 IGF-1 刺激,其注射侧髁突在发育结束后明显大于对照侧髁突,证实 IGF-1 可促使髁突的过生长,且其体重增长期与其他刺激组无明显差异,表明 IGF-1 促进髁突过生长的方式是通过加强其生长速率而非延长其发育时间来实现的,Fukaya 等^[8]的研究也有相似的结论。甚至在成年鼠中也有促进髁突尤其是髁突软骨生长^[9]及软骨内骨化的作用。相应的通过 NVP-AEW541 阻断 IGF-1 信号通路即可使注射侧髁突发育迟缓于对照侧髁突,表明 IGF-1 在髁突生长过程中,与其生长速率有重要的关联,国内外目前尚未见类似的实验研究报告,但有实验证实阻断 IGF-1 受体可抑制局部活跃组织(如癌组织)的生长^[10,11]。Cyclopamine 刺激组试图通过关节腔内注射 Cyclopamine 阻断 Shh 信号通路,反向验证 Shh 在软骨过度生长中的作用,却未出现预想中的髁突生长受抑制,有类似研究表明 Cyclopamine 阻断 Shh 通路可抑制生长活跃的组织如(胰腺癌组织)^[12,13]的生长,却有研究表明相反的结论:Cyclopamine 在骨关节炎鼠中可以减少软骨细胞凋亡^[14],从而减少软骨破坏,这与本课题组前期研究中 Shh 可抑制软骨细胞凋亡的结论不符,这表明 Shh 同样活跃的参与炎症的进程。也有研究表明,Cyclopamine 不能抑制 Shh 促进斑马鱼鱼鳍骨形成中的作用^[15],而另外的抑制剂,BMS-833923 却有该作用,这表明 Shh-SMO 的信号通路可能在不同的组织生长中存在不同的分支通路,因此本研究的结果原因需实验髁突标本需进一步深入实验探讨。Cyclopamine 与 IGF-1 组连用未能抑制

IGF-1 对髁突生长的促进作用,表明存在信号交联的 Shh 与 IGF-1 介导的信号通路不能证实其具有上下游关系。

本研究首次以基于本课题组前期构建的 IGF-1 为节点的髁突肥大病理发生发展的理论为指导,成功地在活体动物体内诱导单侧髁突的过生长,模拟了髁突肥大在青春发育期的髁突生长过程中,动态重现了髁突肥大的发生、发展的病理进程,论证了该理论的正确性,即在髁突肥大的病理进程中,IGF-1 信号通路促使髁突生长加快,最终形成过生长。该实验方法将继续深入了解髁突肥大的病理机制提供了有力的动物模型,最后,由本实验方法发展出基于局部组织的核心信号因子生长调控技术,为广泛开展组织、器官生长的研究提供了新的技术和思路。

参考文献

- [1] Vasconcelos BC, Goncalves F, Andrade A, et al. Mandibular asymmetry: literature review and case report [J]. *Braz J Otorhinolaryngo*, 2012, 78(4) : 137
- [2] Verhoeven TJ, Nolte JW, Maal TJ, et al. Unilateral condylar hyperplasia: a 3-dimensional quantification of asymmetry [J]. *PLoS One*, 2013, 8(3) : e59391
- [3] Olate S, Almeida A, Alister JP, et al. Facial asymmetry and condylar hyperplasia: considerations for diagnosis in 27 consecutive patients [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2013, 6(10) : 937-941
- [4] Meng Q, Long X, Deng M, et al. The expressions of IGF-1, BMP-2 and TGF-beta1 in cartilage of condylar hyperplasia [J]. *J Oral Rehabi*, 2011, 38(1) : 34-40
- [5] 张武阳,陈宇翔,杨璇璇,等. Shh 信号通路对髁突肥大软骨细胞凋亡活性影响的研究 [J]. *牙体牙髓牙周病学杂志*, 2017, 27(3) : 129-133
- [6] Chen Y, Ke J, Long X, et al. Insulin-like growth factor-1 boosts the developing process of condylar hyperplasia by stimulating chondrocytes proliferation [J]. *Osteoarthritis*

Cartilage, 2012, 20(4) : 279-287

- [7] 刘琦,魏小二,邹德荣,等. Mimics 软件在髁突体积和表面积测量中的应用 [J]. *口腔医学研究*, 2017, 33(4) : 404-408
- [8] Fukaya S, Kanzaki H, Miyamoto Y, et al. Possible alternative treatment for mandibular asymmetry by local unilateral IGF-1 injection into the mandibular condylar cavity: experimental study in mice [J]. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 2017, 152(6) : 820-829
- [9] Suzuki S, Itoh K, Ohya K. Local administration of IGF-1 stimulates the growth of mandibular condyle in mature rats [J]. *J Orthod*, 2004, 31(2) : 138-143
- [10] Kojima I, Iikubo M, Kobayashi A, et al. High serum levels of IGF-I contribute to promotion of endochondral ossification in mandibular condyle and cause its specific elongation in acromegaly-like rats [J]. *Horm Metab Res*, 2008, 40(8) : 533-538
- [11] Nordstrand A, Bergström SH, Thysell E, et al. Inhibition of the insulin-like growth factor-1 receptor potentiates acute effects of castration in a rat model for prostate cancer growth in bone [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2017, 34(3-4) : 261-271
- [12] Xu L, Qi Y, Xu Y, et al. Co-inhibition of EGFR and IGF1R synergistically impacts therapeutically on adrenocortical carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(24) : 36235-36246
- [13] Zhao J, Wang H, Hsiao CH, et al. Simultaneous inhibition of hedgehog signaling and tumor proliferation remodels stroma and enhances pancreatic cancer therapy [J]. *Biomaterials*, 2018, 159 : 215-228
- [14] Li R, Cai L, Ding J, et al. Inhibition of hedgehog signal pathway by cyclopamine attenuates inflammation and articular cartilage damage in rats with adjuvant-induced arthritis [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2015, 67(7) : 963-971
- [15] Armstrong BE, Henner A, Stewart S, et al. Shh promotes direct interactions between epidermal cells and osteoblast progenitors to shape regenerated zebrafish bone [J]. *Development*, 2017, 144(7) : 1165-1176

[收稿日期:2018-02-26]

(本文编辑 关隽)