



李松, 医学博士, 教授, 博士生导师. 中华口腔医学会理事, 中华口腔医学教育委员会常委, 中华口腔医学会颞颌关节病与颌学专业委员会委员, 中国高等教育学会医学教育分会理事, 中华医学会医学教育分会委员, 云南省口腔医学会副会长, 云南省高等教育学会常务理事, 云南省高等教育学会医学分会副理事长、秘书长. 《中华生物医学工程杂志》编委, 《昆明医科大学学报》副主编, 国家自然科学基金项目评审专家. 1985年昆明医科大学毕业后一直在昆明医科大学工作, 现任昆明医科大学副校长. 1991年至1992年赴日本大阪齿科大学研修, 1996年至1999年在第四军医大学口腔医学院攻读博士, 获得医学博士学位. 长期从事口腔医学方面的研究, 创建了昆明医科大学口腔医学研究所. 主要研究方向: 颞颌关节的生理与病理、口腔正畸治疗与颞颌关节. 主持和参与国家基金5项, 云南省基金6项; 获得省部级科技成果奖6项, 其中省二等奖2项, 三等奖4项. 发表论文70余篇, 其中核心期刊、SCI期刊20余篇. 遴选为云南省中青年学术与技术带头人, 获得国际牙医师学会院士称号. 为研究生开设课程2门, 培养研究生33名, 其中博士生2名, 硕士生31名; 获得省级教学成果奖4项, 其中省级一等奖2项, 二等奖2项.

## 下颌髁状突软骨与生长板软骨生长发育的比较研究

髁状突是颞下颌关节的重要组成部分, 髁状突的生长发育与下颌骨生长及面部形态的形成有着密切的关系. 髁状突生长区受到局部因素的影响可引起下颌骨发育不足或发育过度, 造成面部畸形. 临床上常采用功能矫形对生长发育期的患者进行矫治, 引导下颌向前或推下颌向后, 从而使下颌的生长方向、生长速率发生改变, 促进或抑制下颌的生长, 引导其正常的生长发育, 这一过程主要是通过影响髁状突软骨的生长发育来实现. 随着技术发展, 从细胞生物学和分子生物学研究髁状突软骨的生长特性不仅成为可能而且具有重要意义.

### 1 髁状突软骨和生长板软骨的组织来源和生长特性比较

下颌髁状突软骨和生长板软骨是不同部位的两种软骨. 笔者通过对胚胎SD大鼠的下颌髁状突软骨与胫骨生长板软骨作组织学染色, 发现发育早期, 下颌髁状突软骨与胫骨生长板软骨组织结构大体相似, 但在软骨细胞分层、形态及排列方式方面存在一定差异. 髁状突是下颌骨的重要生长区, 而生长板软骨是长骨的生长中心, 因而其生长特性的研究越来越受到关注<sup>[1]</sup>. 髁状突软骨是在种系发生和个体发育过程中继发形成的, 称为继发性软骨 (Secondary cartilage), 主要由纤维软骨构成; 它既

受局部因素的影响又受生长因素的影响. 生长板软骨为原发性软骨 (Primary cartilage), 主要由透明软骨构成, 其生长主要受遗传因素、全身性因素, 特别是促生长激素-生长调节素复合体, 性激素和甲状腺素的作用, 局部因素对其生长的作用较小. 虽然二者的发育过程均为软骨内成骨, 但是它们在胚胎发生、组织来源、生物学特性及对生长因子的反应等诸多方面存在一定的差异.

### 2 髁状突软骨和生长板软骨细胞的信号转导

细胞信号转导通路就是指细胞接受外界信号, 通过一整套特定的机制, 将胞外信号转导为胞内信号, 最终调节特定基因表达, 并引起细胞应答反应的过程. 对于一个细胞来讲, 它所能感知的环境信号: 一是环境的固有参数如压力、温度等; 二是来源于其他细胞的一些信号, 这些信号或者是其他细胞与该细胞的直接接触, 或者是其他细胞分泌到环境中的一些特定的信号分子如生长因子、细胞因子等. 髁状突软骨和生长板软骨细胞的信号转导研究较多, 但目前尚未看到有本质的差异. 软骨细胞在发育成熟过程中, 在各种生长因子、细胞因子及各种外界环境如机械压力等的作用下, 发生形态和生化的改变, 这些变化通过特定的细胞信号转导通路

使特定基因表达启动或关闭而引起。对软骨生长发育调控的信号通路主要有转化生长因子  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 超家族及其相关通路、印第安刺猬蛋白 (Ihh) 信号通路、Notch 信号通路等。TGF- $\beta$  超家族信号通路主要通过其受体的磷酸化并激活细胞内信号蛋白 Smads 来实现的, Smad4 在此过程中发挥着重要作用。Smad4 是细胞内 TGF- $\beta$  信号通路的核心信号转导分子。Zhang<sup>[2]</sup>等用 Cre-loxP 系统造成小鼠 Smad4 基因突变模型, 发现 Smad4 的缺失导致生长板短小及紊乱, 软骨细胞增殖减少, 肥大细胞分化加速, 凋亡增加, 从基因学角度证明了 Smad4 介导的 TGF- $\beta$  信号可抑制生长板软骨细胞肥大分化, 维持生长板软骨细胞的正常组织形态。Ihh 对软骨细胞的分化具有直接和间接的调控作用, 它可以在软骨细胞分化的多个阶段阻断细胞分化通路, 也能间接地通过与甲状旁腺素 / 甲状旁腺素相关肽受体形成的一个负反馈环路协调软骨细胞的增殖、分化与成熟。同时, Ihh 上游信号可调控胚胎软骨细胞增殖和分化, 主要有骨形态形成蛋白、成纤维生长因子、核心结合因子等, 而核心结合因子可能是成软骨细胞的关键启动基因。在小鼠和鸡的四肢发育过程中, Notch 信号通路在生长板软骨发生的早期和前肥大软骨细胞向肥大软骨细胞转变的过程中起着重要作用<sup>[3,4]</sup>。研究显示, Notch2 受体广泛地分布在关节软骨和生长板, 其中增殖软骨细胞、前肥大软骨细胞和肥大软骨细胞中都有表达<sup>[5]</sup>。在小鼠的生长发育过程中, Notch3 受体特定地分布于关节软骨的深层及生长板的肥大软骨细胞中。这些信号通路共同参与了细胞内基因的表达; 同时, 一种受体蛋白也可以激活几种不同的通路。软骨细胞合成的众多生长因子、细胞因子以及细胞之间的信号转导在时空上形成一个复杂的网络调节系统控制着软骨组织的发生、改建及创伤修复等病理生理过程。髌状突软骨细胞在周期性单轴压应力作用下 Raf 激酶抑制蛋白 (RKIP) 及其 mRNA 变化, 提示 RKIP 在髌状突软骨细胞的早期力学应答机制中可能扮演着相当重要的作用, 也有认为是信号通路的构成部分<sup>[6]</sup>。

### 3 髌状突软骨与生长板软骨组织、细胞生物学差异

髌状突软骨和生长板软骨虽然是两种不同性质的软骨, 但在组织学、生物化学等方面有相似地方。研究发现, 生长发育期髌状突软骨与生长板软骨的组织结构大体相似, 但在软骨细胞形态、分层、

排列、血管长入、软骨内成骨等方面存在一定的差异, 显现出发育期两种软骨不同的生长特点。在细胞排列方式上, 生长板软骨细胞为高度有次序排列的组织; 而髌状软骨的结构有其特有的“层域化”, 即由于软骨细胞的排列密度、细胞大小及其周围的基质钙化程度不同而造成的界线明显的细胞层。髌状具有增龄性改变, 随着年龄增加, 厚度逐渐变薄, 纤维成分逐渐增多, 软骨细胞成分有所减少, 以适应髌状软骨的关节功能。生长板软骨中肥大软骨细胞的出现较髌状突软骨早。鲍向红等<sup>[7]</sup>对兔正常颞下颌关节和膝关节进行了比较研究认为, 软骨基质中主要生物大分子成分在颞下颌关节和膝关节软骨中没有明显的差异, 颞下颌关节软骨完全具备和膝关节透明软骨相同的生物化学特征。国外学者从纤维软骨和透明软骨中分离的细胞置于体外培养后, 都呈现出梭形, 体外传 2~3 代后, 这些细胞从形态上已不能区分, 此时细胞能够分化为纤维软骨来源的细胞或者透明软骨来源的软骨细胞<sup>[8,9]</sup>。不同结缔组织来源细胞均能再次分化为其他组织细胞, 说明了该组织细胞的高度可塑性。笔者研究还发现: 发育早期 2 种软骨内 PTHrP mRNA 表达, 髌状突软骨中, PTHrP mRNA 在增殖层和前肥大层强表达; 在生长板软骨中, 其主要表达在软骨膜细胞和关节周围的软骨细胞, 前肥大层中也有较强的表达, 增殖层弱表达, 提示发育早期, PTHrP 对这 2 种不同软骨细胞调控呈现差异。生长板软骨细胞通过体外离心管培养技术可形成软骨组织结构, II 型胶原免疫组化染色阳性, 至第 4 周培养物结构形态无明显变化; 同等条件下, 髌状突软骨细胞未能形成软骨组织结构, 加入生长板软骨细胞的共培养有助于髌状突软骨细胞形成软骨结构培养物。

### 4 TGF- $\beta$ 与髌状突软骨及生长板软骨生长发育

目前发现与软骨生长发育的相关生长因子很多, 有转化生长因子  $\beta$  (TGF- $\beta$ )、成纤维生长因子 (FGF)、胰岛素样生长因子 (IGF) 等。在这些生长因子中, FinnsonKW<sup>[10]</sup>认为 TGF- $\beta$  在关节软骨的发育、形成及修复方面扮演着关键的角色。TGF- $\beta$  对软骨细胞的基因表达调节作用取决于细胞的成熟状态及其分化阶段。一般认为对于未分化的细胞, TGF- $\beta$  是一种生长因子, 促进其增殖及分化; 而对于软骨细胞终末分化乃至胞外基质的钙化则是一种抑制剂。张敏等<sup>[11]</sup>的研究结果表明, TGF- $\beta$  在下颌髌状突软骨的增殖层、成软骨细胞

层和肥大层均有表达,其中成软骨细胞层的表达最强.说明未分化的细胞及成熟的细胞都有TGF- $\beta$ 表达,但正在分化成熟的细胞表达更强.Kawakami Y<sup>[12]</sup>近年来通过基因、细胞及生物化学方法提示TGF- $\beta$ 信号分子和及转录因子Sox9的活性对于四肢软骨形成起着重要的作用.Matsunobu T<sup>[13]</sup>用免疫组化方法对大鼠生长板软骨检测TGF- $\beta$ ,发现从6至24周TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2、TGF- $\beta$ 3在静止层、增殖层和成熟层表达,TGF- $\beta$ 2在6周时表达,随后降低,TGF- $\beta$ 受体1在整个发育过程中伴有,提示TGF- $\beta$ 在骨骺端生长板软骨中具有时空变化,对软骨内成骨起着重要的作用.Li等<sup>[14]</sup>研究指出在软骨内成骨活动中,TGF- $\beta$ 是强力的阻滞剂,可阻滞生长板软骨向终末分化,从而维持软骨细胞稳定性.Tchetina E等<sup>[15]</sup>用RT-PCR检测小牛近端胫骨生长板的相关因子(MMP、TGF- $\beta$ 、bFGF等)的表达,发现生长板软骨生长发育不同时期对应相应的基因表达,TGF- $\beta$ 1及Ihh在生长板软骨细胞基质钙化和终末分化期特异性表达.Li也发现TGF- $\beta$ 激活蛋白激酶MAPK、PKA及PKC,与其他信号通路相互作用,对骺生长板软骨细胞终末分化起到潜在的抑制作用.Matsunobu T等<sup>[16]</sup>通过TGF- $\beta$ 1受体ALK基因敲除小鼠模型,观察到小鼠长骨短而宽,骨领和骨小梁减少,提示TGF- $\beta$ 信号在长骨软骨膜形成、分化及生长板完整性方面起着重要的作用.

TGF- $\beta$ 有TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2、TGF- $\beta$ 3、TGF- $\beta$ 4四种亚型,这些亚型有相似的生物学活性,但它们与受体的亲和力不同<sup>[17]</sup>.其中TGF- $\beta$ 2在软骨诱导及软骨内成骨方面作用更强,同时对软骨生长发育也起着重要的作用.TGF- $\beta$ 2是由2个结构相同或相近的、相对分子质量为12500的亚单位借二硫键连接的二聚体<sup>[18]</sup>.TGF- $\beta$ 2从以下几方面诱导成软骨效应:(1)增强软骨转录因子Sox9的表达,促进细胞聚集,促进软骨分化;(2)抑制软骨细胞肥大分化<sup>[19]</sup>;(3)抑制软骨细胞胶原降解,促进蛋白多糖合成<sup>[20]</sup>;(4)通过PI3K/Akt通路诱导基质金属蛋白酶组织抑制因子表达来抑制关节软骨的降解;(5)通过调节甲状旁腺激素相关蛋白的分泌,促进软骨细胞分化成熟及软骨细胞特异性的细胞外基质表达<sup>[21]</sup>.TGF- $\beta$ 2产生的胶原沉积和蛋白聚糖水平高于其他亚型,表现出更强的成骨诱导特性.Spagnoli A<sup>[22]</sup>通过建立小鼠TGF- $\beta$ 2受体基因(Tgfr2)敲除模型,发现指间关节缺失,证明Tgfr2可引起持续的软骨细胞分化异常.但也有学者Baffi M O等<sup>[23]</sup>建立小鼠

TGF- $\beta$ 2受体基因(Tgfr2)缺失模型,发现在胚胎17.5 d时,长骨的长度及矿化没有改变,软骨细胞分化标志性因子表达也没有改变,提示TGF- $\beta$ 2的缺失不会影响胚胎时期软骨内骨形成.Serrano等<sup>[24]</sup>通过用外源性的TGF- $\beta$ 2作用于体外培养的下颌髁状突器官,发现可下调Notch1、Twist1、2基因表达进而影响下颌髁状突软骨细胞的成熟分化.Alvarez J等<sup>[25]</sup>用Shh(Ihh的替代物)刺激培养的胚胎期的跖骨器官,使其表达TGF- $\beta$ 2、3mRNA,发现Shh作用效果依赖于TGF- $\beta$ 2,提示TGF- $\beta$ 2在软骨肥大分化调节的信号通路Ihh及PTHrP表达中起着介导的作用.TGF- $\beta$ 2还能调节其它细胞因子如胰岛素样生长因子、骨形成蛋白、纤维母细胞生长因子,并共同参与软骨细胞生长分化.TGF- $\beta$ 2对软骨组织的再生与修复也起着重要作用<sup>[26,27]</sup>.王卫国<sup>[28]</sup>通过脂质体介导的方法将已构建的pcDNA3.1(+)/TGF- $\beta$ 2转染到体外单层培养的软骨细胞中.采用RT-PCR、ELISA、组织学染色、免疫组化和原位杂交的方法,分别对转染组和未转染组的第1、6、9代细胞进行检测,发现随着传代次数增加,未转染组软骨细胞自身TGF- $\beta$ 2的表达逐渐减弱,转染组TGF- $\beta$ 2在软骨细胞内稳定表达,并对软骨细胞的去分化有抑制作用.TGF- $\beta$ 2在软骨的生理病理过程起着重要的作用.

#### [参考文献]

- [1] GRABER T M, RAKOSI T, PETROVIC A G. 口腔正畸功能矫形治疗学[M].//徐芸,白玉兴,宋一平,主译.北京:人民卫生出版社,2004:24-25,31-33.
- [2] ZHANG J, TAN X, LI W, et al. Smad4 is required for the normal organization of the cartilage growth plate[J]. Dev Biol, 2005, 284(2):311-322.
- [3] KARLSSON C. Neither Notch1 expression nor cellular size correlate with mesenchymal stem cell properties of adult articular chondrocytes[J]. Cells Tissues Organs, 2008, 187(4):275-285.
- [4] OLDERSHAW R A. Notch signaling during chondrogenesis of human bone marrow stem cells[J]. Bone, 2010, 46(2):286-293.
- [5] USTUNELI. The immunohistochemical localization of notch-receptors and ligands in human articular cartilage, chondrogenitor culture and ultrastructural characteristics of these progenitor cells[J]. Acta Histochem, 2008, 110(5):397-407.
- [6] 李焯, 李松, 吴拓江, 等. 体外周期性单轴压应力下髁突软骨细胞Raf激酶抑制蛋白(RKIP)的动态变化研究

- [J]. 实用口腔医学杂志,2007,23(5):616 - 620.
- [7] 鲍向红. 兔正常颞下颌关节与膝关节的比较研究 [D]. 西安:中国人民解放军第四军医大学,2003:1 - 85.
- [8] HARA M, MURAKAMI T, KOBAYASHI E. In vivo bioimaging using photogenic rats: fate of injected bone marrow-derived mesenchymal stromal cells [J]. *J Autoimmun*, 2008, 30(3): 163 - 171.
- [9] SQUILLARO T, HAYEK G, FARINA E, et al. A case report: bone marrow mesenchymal stem cells from a Rett syndrome patient are prone to senescence and show a lower degree of apoptosis [J]. *J Cell Biochem*, 2008, 103(6): 1 877 - 1 885.
- [10] FINNISON K W, CHI Y, BOU-GHARIOS G, et al. TGF- $\beta$  signaling in cartilage homeostasis and osteoarthritis [J]. *Front Biosci (Schol Ed)*, 2012, 14:251 - 268.
- [11] 张敏, 李松, 徐芸. 静压力对下颌髁状突软骨转化生长因子  $\beta$  1 表达影响的体外研究 [J]. 实用口腔医学杂志, 2006, 22(6):775 - 778.
- [12] KAWAKAMI Y, RODRIGUEZ-LEON J, IZPISUA BELMONTE J C. The role of TGF $\beta$ s and Sox9 during limb chondrogenesis [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2006, 18(6): 723 - 729.
- [13] MATSUNOBU T, TORIGOE K, ISHIKAWA M, et al. Critical roles of the TGF- $\beta$  type I receptor ALK5 in perichondrial formation and function, cartilage integrity, and osteoblast differentiation during growth plate development [J]. *Dev Biol*, 2009, 332(2):325 - 338.
- [14] LI T F, O'KEEFE R J, CHEN D. TGF- $\beta$  signaling in chondrocytes [J]. *Front Biosci*, 2005, 10(1):6 81 - 6 88.
- [15] TCHETINA E, MWALE F, POOLE A R. Distinct phases of coordinated early and late gene expression in growth plate chondrocytes in relationship to cell proliferation, matrix assembly, remodeling, and cell differentiation [J]. *J Bone Miner Res*. 2003, 18(5):844 - 851
- [16] MATSUNOBU T, TORIGOE K, ISHIKAWA M, et al. Critical roles of the TGF- $\beta$  type I receptor ALK5 in perichondrial formation and function, cartilage integrity, and osteoblast differentiation during growth plate development [J]. *Dev Biol*, 2009, 332(2): 325 - 338.
- [17] LING, LEWCLEE. TGF- $\beta$  Type I Receptor (Alk5) Kinase Inhibitors in Oncology [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2011, 12(12):2 190 - 2 202.
- [18] KATSUNO M, ADACHI H, BANNO H, et al. Transforming growth factor- $\beta$  signaling in motor neuron diseases [J]. *Curr Mol Med*, 2011, 11(1):48 - 56.
- [19] BUCKLAND J. Bone balance restored by blocking Dickkopf-1 in a mouse model of inflammatory arthritis [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2010, 6(12):673.
- [20] TCHETINA E V, ANTONIOU J, TANZER M, et al. Transforming growth factor- $\beta$ 2 suppresses collagen cleavage in cultured human osteoarthritic cartilage, reduces expression of genes associated with chondrocyte hypertrophy and degradation, and increases prostaglandin E (2) production [J]. *Am J Pathol*, 2006, 168(1):131 - 140.
- [21] SETHI A, JAIN A, ZODE G S, et al. Role of TGF $\beta$ /Smad signaling in gremlin induction of human trabecular meshwork extracellular matrix proteins [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011, 52(8):5 251 - 5 259.
- [22] SPAGNOLI A, OREAR L, CHANDLER R L, et al. TGF- $\beta$  signaling is essential for joint morphogenesis [J]. *J Cell Biol*, 2007, 177(6):1 105 - 1 117.
- [23] BAFFI M O, SLATTERY E, SOHN P, et al. Conditional deletion of the TGF- $\beta$  type II receptor in Col2a expressing cells results in defects in the axial skeleton without alterations in chondrocyte differentiation or embryonic development of long bones [J]. *Dev Biol*, 2004, 276(1):124 - 142.
- [24] SERRANO M J, SO S, SVOBODA K K, et al. Cell fate mediators Notch and Twist in mouse mandibular condylar cartilage [J]. *Arch Oral Biol*, 2011, 56(6):607 - 613.
- [22] SPAGNOLI A, OREAR L, CHANDLER R L, et al. TGF- $\beta$  signaling is essential for joint morphogenesis [J]. *J Cell Biol*, 2007, 177(6):1 105 - 1 117.
- [26] TCHETINA E V, ANTONIOU J, TANZER M, et al. Transforming growth factor- $\beta$ 2 suppresses collagen cleavage in cultured human osteoarthritic cartilage, reduces expression of genes associated with chondrocyte hypertrophy and degradation, and increases prostaglandin E (2) production [J]. *Am J Pathol*, 2006, 168(1): 131 - 140.
- [27] KAPETANAKIS S, DRYGIANNAKIS I, KAZAKOS K, et al. Serum TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3 are increased and positively correlated to pain, functionality, and radiographic staging in osteoarthritis [J]. *Orthopedics*, 2010, 33(8):10.
- [28] 王卫国, 娄思权, 余华, 等. TGF- $\beta$  2 转染关节软骨细胞的实验研究 [J]. 中华骨科杂志, 2003, 23(7):434 - 438.

(2014 - 01 - 02 收稿)