

原因结构不同而诱导不同的 Th 亚群, HBcAg 主要诱导产生 IL-2/IFN- γ 以及低水平的 IL-4, 而 HBeAg 主要诱导产生 IL-4 和少量的 IFN- γ , 提示 HBcAg 优先刺激 Th1 样的细胞, HBeAg 优先诱导 Th2 样细胞。Penna 等^[4] 在急性乙肝患者的研究也发现, HBcAg 特异性淋巴细胞群及克隆细胞株分别有 67% 和 77% 表达 IFN- γ 。本研究用 rHBcAg 刺激 PBMC, 主要诱导了急、慢性乙肝患者 IFN- γ 的增高, 而 IL-4 增加较少, 似乎佐证了上述发现。如此看来, 基础血清中的检测应该更加符合患者的真实细胞因子水平。

本研究对基础血清检测的结果显示, 急性乙肝患者血清 IFN- γ 、IL-4 水平显著高于健康对照组, 但 IFN- γ /IL-4 比值接近于健康对照, 表明急性自限性 HBV 感染时两类细胞因子的调高趋于平衡。慢性乙型肝炎患者血清中 IFN- γ 、IL-4 水平虽也显著高于健康对照组, 但 IFN- γ /IL-4 比值显著低于健康对照, 表明慢性乙型肝炎患者的细胞因子调高可能存在失衡。

本研究中无症状 HBV 携带者无论是血清还是培养上清的 IFN- γ 和 IL-4 水平显著低于急、慢性乙肝患者, PBMC 培养上清的 IFN- γ 和 IL-4 水平虽高于健康对照但差异无显著性。该结果表明处在免疫耐受期和非活动型病毒携带期的无症状 HBV 携带者, 机体的免疫状态与急性乙肝的免疫清除期和慢性乙肝的活动期有所不同。在本研究中, 虽经 rHBcAg 刺激, 无症状 HBV 携带者培养上清的 IFN- γ 增高并不明显, 这与有些研究报道的结果不同^[5]。可能与添加刺激物的浓度不同以及是否使用共刺激抗体分子等因素有关。

Th1 样细胞分泌的 IL-2、IFN- γ 等细胞因子,

主要参与细胞免疫介导的炎症反应。Th2 样细胞分泌的 IL-4、IL-10 等细胞因子, 主要介导体液免疫应答。如 Th1 类细胞亚群占优势, 将促进细胞免疫反应, 增强 CD8⁺T 细胞的细胞毒活性, 从而清除细胞内病毒, 同时引起肝细胞损伤; 如 Th2 样细胞占优势, 将促进体液免疫反应, 并抑制细胞免疫反应, CD8⁺T 细胞活性减弱, 肝细胞损伤减轻。Th1/Th2 失衡被认为是 HBV 慢性感染发生和持续的原因^[3]。近年来, 人们对 HBV 感染时可能存在的非溶细胞机制清除肝细胞内病毒颇为关注, 多项研究提示其效应分子主要为 IFN- γ ^[6]。因而 HBV 感染时 IFN- γ 表达水平可能与疾病转归密切相关。

参考文献

- 1 Chang JJ, Lewin SR. Immunopathogenesis of hepatitis B virus infection[J]. Immunol Cell Biol, 2007, 85: 16-23
- 2 Slone SP, Martin AW, Wellhausen SR, et al. IL-4 production by CD8+ lymphomatoid papulosis, type C, attracts background eosinophils[J]. J Cutan Pathol. 2008, 35(Suppl 1): 38-45
- 3 Milich D R, Schödel F, Hughes JL, et al. The hepatitis B virus core and e antigens elicit different Th cell subsets: antigen structure can affect Th cell phenotype[J]. J Virol, 1997, 71(3): 2192-2201
- 4 Penna A, Del Prete G, Cavalli A, et al. Predominant T-helper 1 cytokine profile of hepatitis B virus nucleocapsid-specific T cells in acute self-limited hepatitis B[J]. Hepatology, 1997, 25(4): 1022-1027
- 5 熊仕秋, 王莉, 李明昌, 等. 无症状乙型肝炎病毒携带者外周血单个核细胞分泌细胞因子的研究[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(16): 1580-1583
- 6 Chang JJ, Lewin SR. Immunopathogenesis of hepatitis B virus infection[J]. Immunol Cell Biol, 2007, 85: 16-23

(收稿: 2009-12-11)

(修回: 2010-01-08)

渐进性咬合紊乱大鼠咬肌线粒体 Ca^{2+} 超载及超微结构变化的研究

张 婧 熊利峰 刘晓东 于世宾 付玉婷 王美青

摘 要 目的 研究渐进性咬合紊乱对大鼠咬肌线粒体 Ca^{2+} 含量及超微结构的影响。**方法** 8 周龄雌性 SD 大鼠 50 只, 实

基金项目: 国家自然科学基金资助(30540130469, 30872870)

作者单位: 710032 西安, 第四军医大学口腔医学院口腔解剖生理学教研室及颞下颌关节病科(张婧、刘晓东、于世宾、付玉婷、王美青); 441021 襄樊, 解放军 477 医院口腔科(熊利峰)

通讯作者: 王美青, 电子信箱: mqwang@fmmu.edu.cn

验组(40 只)以推第 3 磨牙向远中移动的方法建立渐进性咬合紊乱,其中 10 只仅建立咬合紊乱,20 只给予含硝苯地平的二甲基亚砜(DMSO)溶液,10 只仅给予 DMSO 溶液;另外 10 只为操作对照。各组分别于实验开始后 1 周和 4 周取材,观察咬肌超微结构,测定咬肌线粒体 Ca^{2+} 含量。结果 各时间点的咬合紊乱组及咬合紊乱给予 DMSO 组双侧咬肌均出现超微结构紊乱及线粒体 Ca^{2+} 含量的明显增加($P < 0.001$);而咬合紊乱给予硝苯地平组与操作对照组之间无明显差异($P > 0.05$),超微结构未观察到明显改变。结论 渐进性咬合紊乱可导致大鼠咬肌运动性损伤,表现为线粒体 Ca^{2+} 超载及超微结构异常。

关键词 渐进性咬合紊乱 咬肌 超微结构 线粒体 钙离子

Mitochondria Ca^{2+} Overload and Ultrastructure Changes in Masseter Muscle of Rats Induced by Experimental Created Disordered Occlusion. Zhang Jing, Xiong Lifeng, Liu Xiaodong, Yu Shibin, Fu Yuting, Wang Meiqing. Department of Oral Anatomy and Physiology and TMD, School of Stomatology, Fourth Military Medical University, Xian 710032, China

Abstract Objective To study the effects of the ECDO on the ultrastructure and the mitochondria Ca^{2+} content of the rat's masseter muscle. **Methods** 8-week-old female SD rats were adopted for the experiments. First of all, the experimentally created disordered occlusion (ECDO) was established by moving the left maxillary and right mandibular third molars distally about 0.8mm. The rats were randomly assigned to 4 groups, with 10 for operation control, 10 for ECDO, 20 for ECDO + Nifedipine (in dimethyl sulphoxide, DMSO) injection and 10 for ECDO + DMSO injection. The ultrastructure of masseter was observed by transmission electron microscope (TEM) and the contents of mitochondria Ca^{2+} in masseter muscles were tested in all groups at the time points of 1 week and 4 weeks after operation. **Results** In ECDO and ECDO + DMSO groups, the mitochondria Ca^{2+} contents ($P < 0.001$) increased significantly and the ultrastructure changed obviously. In ECDO + Nifedipine group, however, the ultrastructure and mitochondria Ca^{2+} contents ($P > 0.05$) were not different from the operation control group. **Conclusion** ECDO could lead to the injury of rat masseter muscle, presenting with the changes of ultrastructure and Ca^{2+} overload in mitochondria.

Key words Experimental created disordered occlusion; Masseter muscle; Mitochondria; Ultrastructure; Calcium

咀嚼肌功能紊乱是颞颌关节紊乱病(temporomandibular disorders, TMD)的主要症状之一。有研究表明,降低和加高动物咬合,咬肌均会出现肌节排列紊乱,线粒体肿胀,肌质网空泡化等超微结构改变,肌细胞及线粒体内 Ca^{2+} 会明显增加,而在给予 EDTA、丹曲林等 Ca^{2+} 阻断剂后,肌细胞及线粒体内 Ca^{2+} 含量以及肌纤维超微结构均与对照组无明显差异^[1-3]。参考骨骼肌运动损伤的特征^[4-6],降低或加高咬合所引起的咬肌异常应系运动损伤。

自 2000 年以来本课题组先后报道了渐进性咬合紊乱导致猕猴、新西兰大白兔和 SD 大鼠髁突软骨退化性变的实验结果^[7-13]。本研究拟采用该 SD 大鼠模型,研究咬合紊乱大鼠咬肌超微结构损伤状态及线粒体 Ca^{2+} 含量变化,并与注射 Ca^{2+} 阻断剂硝苯地平的实验组进行比较,观察其对咬肌超微结构及线粒体内 Ca^{2+} 含量变化的影响,以期证明渐进性咬合紊乱大鼠咬肌也存在着运动性损伤。

材料与方法

1. 实验动物:8 周龄雌性 SD 大鼠 50 只,体重 180~200g。

2. 实验方法:(1)分组情况见表 1。(2)咬合紊乱模型建立方法:咬合紊乱组:采用类似我们曾经报道的方法^[7-13],麻醉大鼠后,将皮圈塞入左上、右下颌第 2、3 磨牙间,以第 1、2 磨牙为支抗,借助皮圈扩张力逐渐推第 3 磨牙向远中移动,形成约 0.8mm 间隙,造成上下颌磨牙尖窝不吻合的咬合状态。

(3)操作对照设计:模仿咬合紊乱组的分牙操作,但将皮圈塞入牙间隙后立即取出,不滞留。(4) Ca^{2+} 阻断剂硝苯地平溶剂的制备与注射:咬合紊乱 + 硝苯地平(nifedipine)组:称量每只大鼠体重,按 5mg/kg 体重称取硝苯地平(N7634, Sigma-Aldrich, 美国)溶于 0.2ml 二甲基亚砜(dimethyl sulphoxide, DMSO)中,于分牙前 1h(上午 8:30)开始,腹腔注射,之后同时间、同剂量每天注射 1 次直到取材。其他操作同咬合紊乱组。咬合紊乱 + DMSO 组:所有操作同注射硝苯地平组,只是注射 0.2ml 溶剂 DMSO,每天 1 次直到取材。

3. 透射电镜样本制备:于实验开始后 1 周、4 周分别处死动物,快速取双侧咬肌后部深层的部分肌肉组织,以锋利的刀片修整成 1mm×1mm×2mm 大小,4% 戊二醛固定 2h,1% 四氧化锇固定 2h,梯度丙酮脱水,浸透,包埋,超薄切片,电子染色,透射电镜观察(JEM-100SX, JEOL 公司,日本)。

4. 咬肌线粒体 Ca^{2+} 含量检测:于实验开始后 1 周、4 周分别处死动物,快速取大鼠双侧咬肌后部的肌肉组织约 100mg,在 4℃ 条件下以差速离心法采用组织线粒体分离试剂盒(C3606, 碧云天, 中国)尽快提取咬肌线粒体,之后部分样本用原子吸收分光光度计(日立 Z-2000, 日立公司, 日本)检测 Ca^{2+} 含量,部分样品用 BCA 蛋白定量试剂盒(P0012, 碧云天, 中国)检测线粒体蛋白含量,以两者比值($\mu\text{g}/\text{mg}$)表示线粒体 Ca^{2+} 含量。

5. 统计学分析:应用 SPSS12.0 统计软件对各组动物双侧咬肌线粒体 Ca^{2+} 含量进行三因素析因分析,两两组间用 LSD-t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 透射电镜观察: (1) 操作对照组: 咬肌纤维结构正常, 肌原纤维排列整齐, 线粒体大小均匀, 排列整齐, 嵴较多 (图 1 中 a, 图 2 中 a、b)。 (2) 咬合紊乱组: 肌纤维的部分线粒体变大变圆, 基质电子密度降低, 嵴断裂变短变少, 甚至消失, 伴随线粒体肿胀可见肌质网空泡化 (图 1 中 b、c, 图 2 中 c、d)。 (3) 咬合紊乱 + 硝苯地平组: 肌纤维超微结构基本同操作对照

组 (图 2 中 e、f)。 (4) 咬合紊乱 + DMSO 组: 肌纤维超微结构基本同咬合紊乱组 (图 2 中 g、h)。

表 1 各组动物样本量分布情况 (n)

	操作对照组	咬合紊乱组	咬合紊乱 + 硝苯地平组	咬合紊乱 + DMSO 组
1 周	5	5	10	5
4 周	5	5	10	5

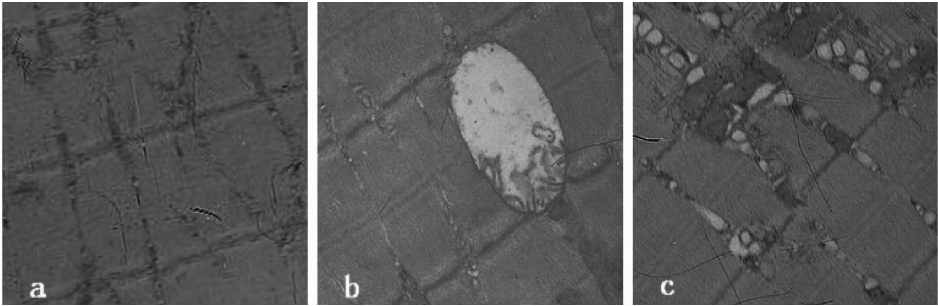


图 1 咬肌纤维超微结构 (TEM, ×20000)

a. 操作对照组, 超微结构基本正常; b. 咬合紊乱组, 可见线粒体变大变圆, 基质变清变浅, 嵴断裂消失; c. 咬合紊乱组, 可见肌质网肿胀、空泡化

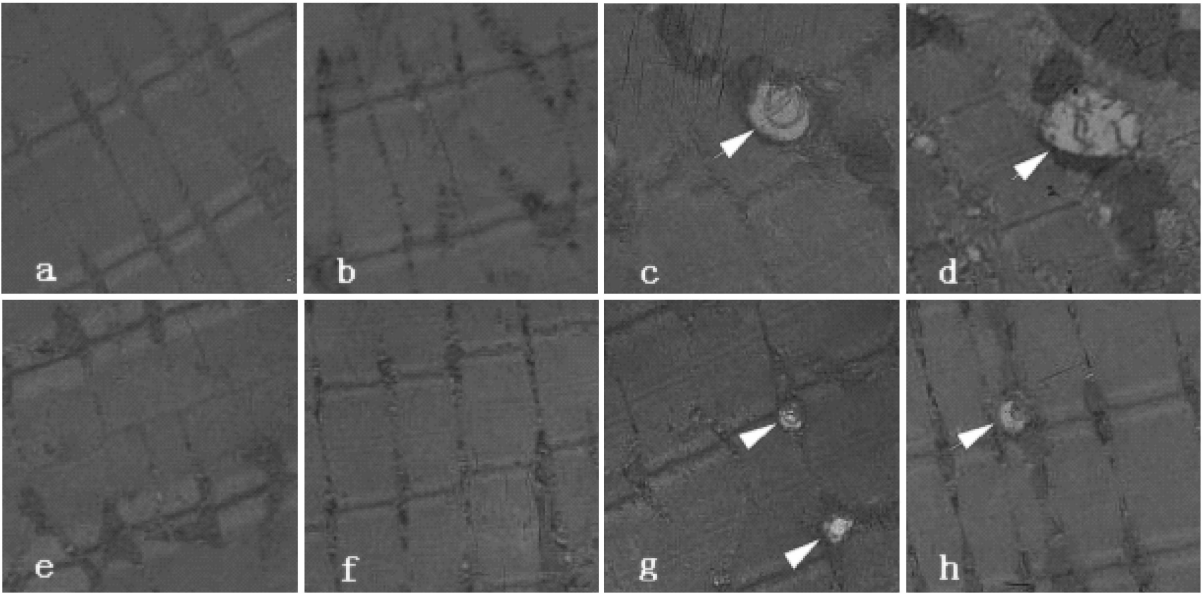


图 2 各组咬肌超微结构 (TEM, ×10000)

图中箭头所示为肿胀的线粒体。a. 1 周操作对照组; b. 4 周操作对照组; c. 1 周咬合紊乱组; d. 4 周咬合紊乱组; e. 1 周咬合紊乱 + 硝苯地平组; f. 4 周咬合紊乱 + 硝苯地平组; g. 1 周咬合紊乱 + DMSO 组; h. 4 周咬合紊乱 + DMSO 组

2. 线粒体 Ca^{2+} 含量: 左右两侧咬肌线粒体 Ca^{2+} 含量无明显差异 ($P = 0.356$), 而不同实验组之间存在明显差异 ($P < 0.001$), 时间因素无显著效应 ($P = 0.392$); 侧别与组间因素 ($P = 0.364$)、侧别与时间因素 ($P = 0.609$)、组间与时间因素 ($P = 0.821$) 之间均无交互效应。咬合紊乱组线粒体 Ca^{2+} 含量明显高于操作对照组 ($P < 0.001$), 咬合紊乱 + DMSO 组与咬

合紊乱组间无明显差异 ($P = 0.927$), 也明显高于操作对照组 ($P < 0.001$), 而咬合紊乱 + 硝苯地平组与操作对照组间无明显差异 ($P = 0.944$), 见图 3。

讨 论

本研究中大鼠渐进性咬合紊乱的建立, 采取了推第 3 磨牙向远中移动的方法, 破坏了原有的尖窝吻合的咬合接触关系, 逐渐形成不稳定咬合。在本课题组

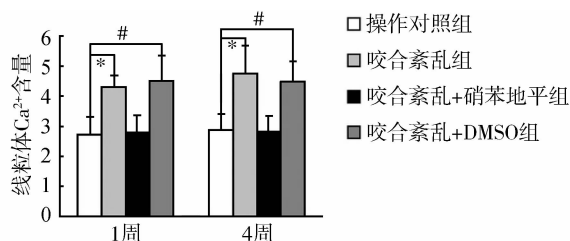


图 3 各组大鼠咬肌线粒体 Ca^{2+} 含量比较

* 咬合紊乱组与操作对照组比较, $P < 0.05$; #咬合紊乱 + DMSO 组与操作对照组比较, $P < 0.05$

前期实验中已证实,该类咬合变化可引起大鼠髁突软骨的骨关节病样变^[7-13],其机制可能是生物力异常,而这一异常的生物力应来自升颌肌异常收缩。研究表明,在运动中肌肉的异常收缩易产生运动性损伤^[6]。本研究结果渐进性咬合紊乱大鼠咬肌出现明显线粒体肿胀和肌质网空泡性变的超微结构改变,线粒体 Ca^{2+} 含量显著增加,与骨骼肌运动损伤后的变化相一致^[4,5],提示渐进性咬合紊乱可能因影响正常咬合运动而导致了咀嚼肌损伤。

在骨骼肌运动损伤过程中,机械牵拉作用一方面导致肌细胞膜通透性增加,另一方面使得肌细胞膜上牵张性阳离子通道开放,细胞外 Ca^{2+} 大量进入胞内,此时线粒体内 Ca^{2+} 的超载可以起到调节细胞内 Ca^{2+} 浓度的作用,因此线粒体内 Ca^{2+} 随之增加,从而影响其代谢,导致线粒体功能和形态受到破坏,进一步影响肌细胞的代谢功能。

那么本动物模型中咬肌 Ca^{2+} 的增加是导致咬肌超微结构紊乱的原因还是一个伴随现象?所增加的 Ca^{2+} 源于何处?祁冬等^[3]加高兔单侧咬合后发现,该侧咬肌线粒体内 Ca^{2+} 含量增加以及超微结构紊乱,而给予 EDTA (Ca^{2+} 阻断剂)的实验组线粒体内 Ca^{2+} 含量与对照组无明显差别,证实咬肌超微结构紊乱与线粒体 Ca^{2+} 含量的增加密切相关。Bani 等^[1,2]在降低大鼠单侧咬合的模型中,也观察到了组织内 Ca^{2+} 增加及超微结构紊乱,而予以丹曲林(骨骼肌松弛药,可能机制为干扰钙从肌质网释放)后,组织内 Ca^{2+} 含量及超微结构与对照组不再有差别,提示该动物模型的咬肌组织内 Ca^{2+} 增加系肌质网 Ca^{2+} 过量释放的结果。

硝苯地平是一种 Ca^{2+} 拮抗剂,其作用机制是阻止细胞外 Ca^{2+} 进入细胞,避免因线粒体 Ca^{2+} 超载引起的一系列反应。本研究中注射硝苯地平的咬合紊乱大鼠,咬肌超微结构没有出现明显变化,线粒体 Ca^{2+} 含量也无明显增加,而仅注射 DMSO 溶剂的咬

合紊乱大鼠,咬肌仍然出现了类似于咬合紊乱组的变化,这说明硝苯地平具有抑制本大鼠模型中咬肌线粒体 Ca^{2+} 增高的作用。因此本研究结果提示:渐进性咬合紊乱所致的大鼠咬肌细胞及线粒体内 Ca^{2+} 增加,来源于胞外 Ca^{2+} 的内流。

总体上讲,本研究所观察到的咬肌超微结构变化以及线粒体 Ca^{2+} 含量的增加,尚属于肌肉轻微损伤的变化,为肌细胞内代谢紊乱性变化。另外,本实验观察期(实验后 4 周内)该影响持续存在。更长实验周期的观察应对进一步分析咬肌损伤的进展情况,以及长期使用硝苯地平对咬肌是否具有持续保护作用或不良影响,提供更加详实的资料。

参考文献

- Bani D, T Bani, M Bergamini. Morphologic and biochemical changes of the masseter muscles induced by occlusal wear: studies in a rat model. *J Dent Res*, 1999, 78 (11): 1735 - 1744
- Bani D, M Bergamini. Dantrolene counteracts the masseter muscle damage induced by artificial occlusal wear: studies in a rat model. *J Dent Res*, 2001, 80 (11): 1990 - 1994
- 祁冬,汲平,张保华,等. 兔咬合创伤时咬肌损伤与线粒体 Ca^{2+} 超载的研究. *口腔颌面修复学杂志* [J]. 2005, 6 (1): 9 - 15
- Duan C, Delp M D, Hayes D A, et al. Rat skeletal muscle mitochondrial [Ca^{2+}] and injury from downhill walking. *J Appl Physiol*, 1990, 68 (3): 1241 - 1251
- Warhol, M. J, Siegel A J, Evans W J, et al. Skeletal muscle injury and repair in marathon runners after competition. *Am J Pathol*, 1985, 118 (2): 331 - 339
- Morgan D L, D G Allen. Early events in stretch - induced muscle damage. *J Appl Physiol*, 1999, 87 (6): 2007 - 2015
- 元方,王美青,颜朝云,等. 渐进性咬合紊乱导致猴颞下颌关节骨关节炎的实验研究初探[J]. *实用口腔医学杂志*, 2000, 16(1): 27 - 30
- 刘晓东,王美青. 渐进性咬合紊乱对幼年兔颞下颌关节的影响[J]. *实用口腔医学杂志*, 2002, 18 (4): 329 - 331
- 陈金武,王美青,刘晓东. 渐进性咬合紊乱导致兔髁突退行性变的研究[J]. *中华口腔医学杂志*, 2003, 38 (2): 103 - 105
- 孙磊,王美青,刘晓东,等. 渐进性咬合紊乱对大鼠颞下颌关节的影响[J]. *口腔医学研究*, 2005, 21 (3): 230 - 232
- 刘蕾,王美青,孙磊,等. 渐进性咬合紊乱对大鼠髁突软骨肿瘤坏死因子- α 表达的影响[J]. *华西口腔医学杂志*, 2008, 26 (4): 435 - 438
- Jiao K, Wang M Q, Niu, L N, et al. Death and proliferation of chondrocytes in the degraded mandibular condylar cartilage of rats induced by experimentally created disordered occlusion. *Apoptosis*, 2009, 14 (1): 22 - 30
- Sun L, Wang M, He J, et al. Experimentally created nonbalanced occlusion effects on the thickness of the temporomandibular joint disc in rats. *Angle Orthod*, 2009, 79 (1): 51 - 53

(收稿:2009-12-08)

(修回:2010-01-08)