

染料木素对大鼠髁突软骨改建影响的初步研究

王艺臻 徐征丽

摘要 目的 初步探讨染料木素对大鼠 TMJ 髁突软骨改建的影响。**方法** 30 只 8 周龄雌性大鼠,随机分为操作对照组、去势组和去势 + 染料木素组,去势组和去势 + 染料木素组大鼠行双侧卵巢切除术,术后每天给予去势 + 染料木素组大鼠 20mg/kg 的染料木素,6 周后取材。HE 染色观察组织形态变化,通过免疫组化和实时定量 PCR 分别检测 II 型胶原、蛋白聚糖、ER α 和 ER β 的蛋白和 mRNA 水平变化。**结果** ①去势组髁突软骨前部、中部厚度对显著高于操作对照组和去势 + 染料木素组;②去势组髁突软骨中 II 型胶原及 ER α 、ER β 的平均阳性面积百分比显著低于操作对照组和去势 + 染料木素组;③去势组髁突软骨中 II 型胶原、aggrecan 的 mRNA 水平显著低于操作对照组和去势 + 染料木素组;④去势组髁突软骨中 ER β 的 mRNA 水平显著低于操作对照组和去势 + 染料木素组,但 ER α 在各组之间无显著差异。**结论** ①卵巢切除所引起大鼠髁突软骨增厚过程中新合成的软骨基质成分可能不同于正常大鼠髁突软骨;②一定剂量的染料木素可以基本恢复系统雌激素缺乏所造成的髁突软骨组织形态及软骨基质成分的改变,在此过程中染料木素可能主要通过 ER β 发挥作用。

关键词 颞下颌关节 软骨 染料木素 雌激素

Preliminary Study on the Effect of Genistein on Rat Condylar Cartilage Remodeling. Wang Yizhen, Xu Zhengli. Department of Stomatology, Changhai Hospital, The Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

Abstract Objective To investigate the effect of genistein on rat condylar cartilage remodeling. **Methods** Thirty female rats, 8 weeks old, were assigned randomly into sham control group, ovariectomized (OVX) group, OVX and genistein treatment (OVX + Gen) group. The rats from OVX and OVX + Gen groups were ovariectomized. The animals in OVX + Gen group were fed with 20mg/kg genistein per day. All animals were sacrificed 6 weeks later. HE staining was carried out to investigate the morphology of condylar cartilage, and immunohistochemical staining and real-time PCR were performed to investigate the expression of collagen II (Col II), aggrecan, ER α and ER β at protein and mRNA level. **Results** ①The thickness of condylar cartilage in anterior and middle region of OVX group was higher than that of sham control and OVX + Gen group. ②The average percent of Col II, ER α and ER β - positive area in OVX group was lower than that in sham control and OVX + Gen group. ③The mRNA level of Col II and aggrecan in OVX group was lower than that in sham control and OVX + Gen group. ④The mRNA level of ER β in OVX group was lower than that in sham control and OVX + Gen group, but not for ER α . **Conclusion** ①The new synthesized cartilage matrix may be different from that in normal condylar cartilage. ②The changes of morphology and cartilage matrix induced by system estrogen deficiency can be recovered by certain dose of genistein via ER β .

Key words Temporomandibular joint; Cartilage; Genistein; Estrogen

大量流行病学调查显示颞下颌关节紊乱病(TMD)具有明显的女性倾向性,约 80% 前来就诊的患者为女性。这提示 TMD 的发生可能与女性激素尤其是雌激素水平改变有关^[1-4]。以往研究表明卵巢切除可以导致颞下颌关节(TMJ)髁突软骨出现明显的改建甚至退行性变,给予雌激素替代治疗可以在一定程度上恢复髁突软骨的组织形态学参数^[5-8]。近年来,不少研究指出,雌激素替代治疗往往增加乳腺癌、子宫内膜癌、卵巢癌以及心脑血管疾病的发生风

险^[9,10]。植物性雌激素,尤其是染料木素,这种结构上与雌二醇十分相似,富含于豆类食品中的弱雌激素类物质在治疗骨质疏松中的作用逐渐被人们所证实^[11,12]。目前为止,国内外尚未见到关于染料木素对 TMJ 影响的研究报道。本研究拟在卵巢切除基础上,探讨染料木素对 TMJ 髁突软骨改建的影响。

材料与方法

雌性 SD 大鼠 30 只,8 周龄(体重 180 ~ 200g),随机平均分为 3 组:操作对照组、去势组和去势并给予染料木素组,每组 10 只。适应性饲养 3 天后开始动物实验。

1. 动物处理:去势组和去势 + 染料木素组大鼠采用背入式方法进行双侧卵巢切除术。具体方法:30mg/kg 戊巴比妥钠

麻醉下,于俯卧位固定大鼠,以距脊柱约 1cm、距骶部约 1.5cm 处为中心点,备皮,消毒,过中心点平行于脊柱切开约 1cm 的切口,暴露腹腔,寻找菜花样卵巢,结扎血管后切除卵巢,缝合腹腔。操作对照组仅除部分肠系膜组织,其余操作同上。术后去势 + 染料木素组大鼠每天通过灌胃每天给予 20mg/kg 的染料木素(购自上海亿欣生物科技有限公司,染料木素溶解在含有 0.9% 氯化钠、2% Tween 80 和 0.5% 甲基纤维素的水溶液中)。6 周后处死取材。

2. 取材:每组 4 只大鼠用于形态学和免疫组织化学染色,深度麻醉(50mg/kg 戊巴比妥钠)下打开胸腔,经主动脉插管分别灌注生理盐水(200 毫升/只)和多聚甲醛(40g/L, 400 毫升/只),整体取出双侧 TMJ,于 40g/L 的多聚甲醛中后固定 12h,EDTA 液中脱钙 4,常规脱水、石蜡包埋、切片(厚约 6 μ m)。每组其余 6 只大鼠,麻醉下直接取双侧髌突软骨,冻存于 -80℃ 冰箱中备用。

3. 苏木精 - 伊红染色:常规苏木精 - 伊红染色,在 Leica DM2500 显微镜下应用 Leica qwin 软件采集图像,并分别测量髌突软骨前、中、后部的厚度。

4. 免疫组织化学染色:常规脱蜡至水,3% 的过氧化氢孵

育 10min 封闭内源性过氧化物酶,胃蛋白酶处理 10min 充分暴露抗原,正常血清 37℃ 孵育 30min 封闭非特异性位点。Ⅱ型胶原多克隆抗体(santa cruz, sc7763)、雌激素受体 α (ER α) 多克隆抗体(santa cruz, sc542) 和 ER β 多克隆抗体(Abcam, ab3577)以 1:50 稀释,4℃ 孵育过夜。次日依次经生物素化二抗、ABC 复合物 37℃ 孵育 30min。常规 DAB 显色 2min,苏木精轻度衬染,脱水透明,封片。在 Leica DM2500 显微镜下应用 Leica qwin 软件采集图像,并分析阳性表达面积百分比。具体测量方法:在髌突软骨前、中、后部各选取 3 个 80 像素 $\times$ 80 像素、100 像素 $\times$ 100 像素、120 像素 $\times$ 120 像素大小的区域(位于软骨肥大层和过渡层),分别测量阳性面积百分比,最后计算出总的平均阳性面积百分比,用于统计分析。

5. RT-PCR:根据 Genbank 中的大鼠 Ⅱ 型胶原、蛋白聚糖、ER α 和 ER β 核酸序列设计合成 PCR 引物,引物序列见表 1。将髌突软骨标本置于液氮中速冻,取出后迅速捣碎,Trizol 法提取 RNA,定量,按照试剂盒步骤反转录为 cDNA。应用 TaKaRa 公司的实时定量 PCR 试剂盒 ABI 7500 实时定量分析仪上进行 PCR 扩增,以 S18 为内参基因。

表 1 Ⅱ 型胶原、aggrecan、ER α 、ER β 的引物序列

基因	引物序列	扩增片段长度(bp)	基因序号
Collagen Ⅱ	F:5' - AGAACTGGTGGAGCAGCAAGA - 3'	124	NM_012929
	R:5' - ATCTGGACGTTAGCGGTGTTG - 3'		
Aggrecan	F:5' - CCCTCACCCCAAGAATCAAGT - 3'	178	NM_022190
	R:5' - TCATTGGAGCGAAGGTTCTTG - 3'		
ER α	F:5' - TGCGCAAGTGTACGAAGTGG - 3'	108	NM_012689
	R:5' - TTCGGCCTTCCAAGTCATCTC - 3'		
ER β	F:5' - AAAAAGTCAACGTCGAGCCTT - 3'	124	NM_012754
	R:5' - GCTGAATACTCATGGCGGTTG - 3'		
S18	F:5' - CGGCTACCACATCCAAGGAA - 3'	187	M11188
	R:5' - GCTGGAATTACCGCGGCT - 3'		

6. 统计分析:应用 SPSS11.0 进行单因素方差分析,有统计学差异后再用 t 检验两两比较, $P < 0.05$ 被认为有统计学意义。

结 果

1. 形态学观察:如图 1HE 染色图片所示,操作对照组(图 1a)大鼠髌突软骨各层细胞排列整齐,界限清晰,肥大层细胞胞核大而深染。去势组(图 1b)大鼠髌突软骨未出现显著的退行性变,但软骨厚度尤其是肥大层厚度明显增加,同时可见软骨下骨内骨小梁排列杂乱,提示软骨内成骨受到一定的影响。而去势 + 染料木素组(图 1c)髌突软骨厚度又基本恢复到操作对照组水平,软骨细胞与软骨下骨形态与操作对照组相似。细胞的肥大层细胞又呈现出胞核大而深染

的景象。软骨厚度统计结果如图 2 所示,去势组大鼠髌突软骨前部、中部厚度对显著高于操作对照组和去势 + 染料木素组,后两组之间无显著差异。

2. Ⅱ 型胶原及 ER α 、ER β 染色结果:如图 1 所示 Ⅱ 型胶原主要分布于髌突软骨肥大层和过渡层的细胞外基质中,ER α 主要表达于髌突软骨的肥大层和过渡层的软骨细胞中,但 ER β 主要表达于肥大层的软骨细胞中。免疫组化染色结果阳性表达面积百分比统计结果如表 2 所示,去势组 Ⅱ 型胶原及 ER α 、ER β 的平均阳性面积百分比显著低于操作对照组和去势 + 染料木素组,操作对照组和去势 + 染料木素组之间无显著差异。

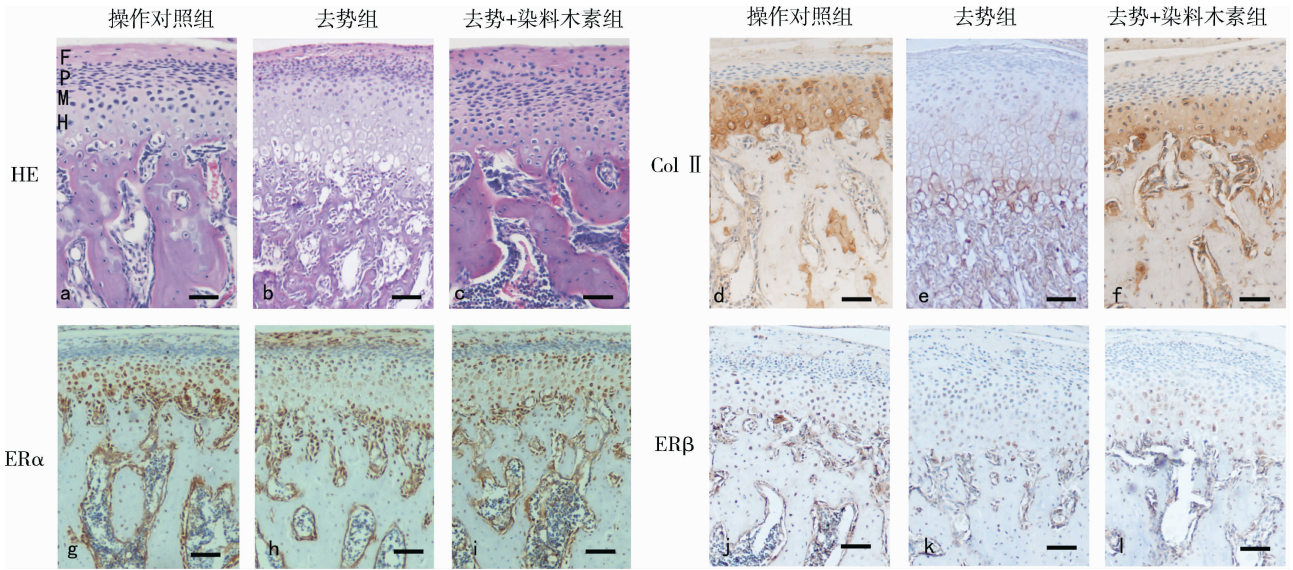


图 1 各组大鼠髁突软骨中部 HE 染色及免疫组化结果
F. 纤维层, P. 增殖层, M. 过渡层, H. 肥大层; 标尺 = 50μm

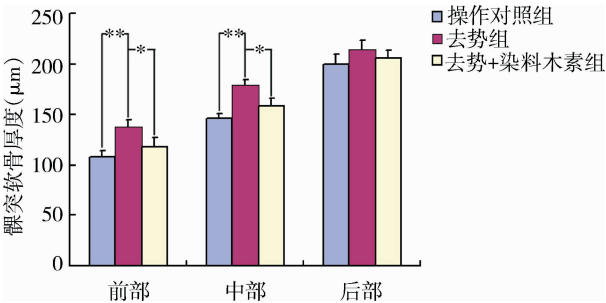


图 2 各组大鼠髁突软骨厚度统计图

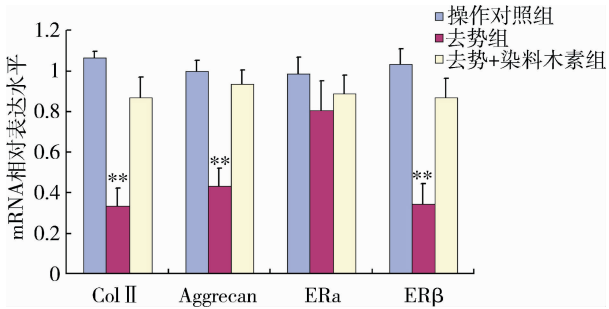


图 3 各组大鼠髁突软骨中Ⅱ型胶原、aggrecan、ERα、ERβ 的 mRNA 水平比较

表 2 Ⅱ型胶原及 ERα、ERβ 染色平均
阳性面积百分比 (%)

组别	Ⅱ型胶原	ERα	ERβ
操作对照组	50.4 ± 7.1	37.9 ± 5.2	19.0 ± 4.5
去势组	19.5 ± 6.7 **	21.7 ± 8.3 *	7.1 ± 6.4 *
去势 + 染料木素组	40.1 ± 9.2	29.4 ± 6.5	16.7 ± 4.8

与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3. Ⅱ型胶原、aggrecan、ERα、ERβ 实时定量 PCR 结果:如图 3 所示,去势组的软骨基质主要成分Ⅱ型胶原、aggrecan 的 mRNA 水平显著低于操作对照组和去势 + 染料木素组。与之类似去势组 ERβ 的 mRNA 水平显著低于操作对照组和去势 + 染料木素组,但 ERα 在各组之间无显著差异。

讨 论

TMD 是口腔第四大常见病,患病率 20% ~ 40%, 以女性多见,多数文献报道女性发病率是男性的 1.5 ~ 2 倍,而且前来就诊的 TMD 患者约 80% 为女

性,种种迹象显示 TMJ 的生长发育以及 TMD 的发生发展可能与雌激素水平改变有关^[1~4]。1996 年开始陆续有日本学者开始研究卵巢切除对年轻大鼠或小鼠 TMJ 的影响,研究发现卵巢切除后 TMJ 髁突软骨厚度明显增加,同时骨量生产减少,整个髁突出现顶部变平等现象,而 E₂ 替代治疗后大部分组织形态参数得到恢复^[5~7]。2000 年国内学者程鹏等^[8]对 20 周龄大鼠进行了双侧卵巢切除,结果发现术后 4、8 周时可见髁突软骨增厚和软骨细胞形态改变等组织学变化,术后 12 周时实验组大鼠骨密度较对照组明显降低并可见到关节表面胶原纤维松解、软骨层次紊乱、肥大层变薄及骨小梁疏松等一系列退行性样改变。

本实验结果显示,大鼠卵巢切除后,尽管髁突软骨未出现显著的退行性变,但前中部软骨厚度尤其是肥大层厚度明显增加,同时可见软骨下骨内骨小梁排

列杂乱,这提示软骨内成骨受到一定的影响,该结果与前期研究基本一致^[5-7]。更有趣的是,尽管卵巢切除可以导致髌突软骨厚度增厚,但软骨基质的主要成分Ⅱ型胶原和蛋白聚糖的表达却呈降低趋势,这可能提示系统雌激素缺乏情况下髌突软骨基质合成也出现了障碍,新合成的软骨基质的成分可能不同于正常髌突软骨,其中的具体机制还需要进一步深入研究。

染料木素是一种植物性雌激素,它是异黄酮类物质中活性功能最高的一种,具有弱雌激素作用^[13]。不少研究表明染料木素有助于缓解女性绝经后雌激素水平下降所引起的骨质疏松、预防骨折发生,更重要的是染料木素可以有效避免由于传统雌激素替代疗法所伴随的乳腺癌、卵巢癌以及心脑血管疾病的发生^[11, 12]。本实验首次尝试将染料木素用于纠正因系统雌激素缺乏而引起的 TMJ 髌突软骨改变,结果表明染料木素不仅可以替代雌激素恢复髌突软骨的组织形态参数,还能纠正系统雌激素缺乏所造成的软骨基质合成异常,染料木素有望成为下一步 TMD 治疗领域的重要候选药物。

有学者指出雌激素主要是通过通过与雌激素受体结合进而影响软骨细胞的代谢^[14, 15]。本实验结果发现卵巢切除后雌激素受体两种亚型的表达均呈降低趋势,这可能与雌激素缺乏环境下雌激素受体的需求降低有关。在给予染料木素之后 ER β 的表达水平显著上调,恢复到操作对照组水平,这一结果提示染料木素对大鼠髌突软骨的作用主要是通过 ER β 来介导的,这也与染料木素与 ER β 的亲合力显著高于 ER α 的表现相吻合^[16]。

综上所述,本实验研究发现,卵巢切除所引起大鼠髌突软骨增厚过程中新合成的软骨基质成分可能不同于正常大鼠髌突软骨;给予一定剂量的染料木素可以基本恢复系统雌激素缺乏所造成的髌突软骨组织形态及软骨基质成分的改变,在此过程中染料木素可能主要通过 ER β 发挥作用。

参考文献

- Nekora - Azak A. Temporomandibular disorders in relation to female reproductive hormones: a literature review. *J Prosthet Dent*, 2004, 91: 491 - 493
- Warren MP, Fried JL. Temporomandibular disorders and hormones in women. *Cells Tissues Organs*, 2001, 169: 187 - 192
- Yu SB, Wang MQ, Li YQ, *et al.* The effects of age and sex on the expression of oestrogen and its receptors in rat mandibular condylar cartilages. *Arch Oral Biol*, 2009, 54: 479 - 485
- Yu SB, Xing XH, Liang SH, *et al.* Locally synthesized estrogen plays an important role in the development of TMD. *Medical Hypotheses* 2009, 72(6): 720 - 722
- Okuda T, Yasuoka T, Nakashima M, *et al.* The effect of ovariectomy on the temporomandibular joints of growing rats. *J Oral Maxillofac Surg*, 1996, 54: 1201 - 1210
- Yamashiro T, Takano - Yamamoto T. Differential responses of mandibular condyle and femur to oestrogen deficiency in young rats. *Arch Oral Biol*, 1998, 43(3): 191 - 195
- Yasuoka T, Nakashima M, Okuda T, *et al.* Effect of estrogen replacement on temporomandibular joint remodeling in ovariectomized rats. *J Oral Maxillofac Surg*, 2000, 58(2): 189 - 196, discussion 196 - 197
- 程鹏, 马绪臣, 李盛琳, 等. 大鼠双侧卵巢切除后颞下颌关节的组织学研究. *中华口腔医学杂志*, 2000, 35(6): 458 - 462
- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. *Lancet*, 1997, 350: 1047 - 1059
- Million Women Study Collaborators. Breast cancer and hormone replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet*, 2003, 362: 419 - 427
- Chanawirat A, Khemapech S, *et al.* Genistein replacement therapy on endothelial dysfunction and bone loss in bilateral ovariectomized rats. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2006, 34: 309 - 314
- Erlandsson MC, Islander U, Moverare S, *et al.* Estrogenic agonism and antagonism of the soy isoflavone genistein in uterus, bone and lymphopoiesis in mice. *APMIS*, 2005, 113: 317 - 323
- Li Y. Phytoestrogen genistein and its pharmacological interactions with synthetic endocrine - active compounds. *Curr Pharm Des*, 2004, 10(22): 2749 - 2757
- Ushiyama T, Ueyama H, Inoue K, *et al.* Expression of genes for estrogen receptors alpha and beta in human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*, 1999, 7: 560 - 566
- Bord S, Horner A, Beavan S, *et al.* Estrogen receptors alpha and beta are differentially expressed in developing human bone. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, 86: 2309 - 2314
- Kostelac D, Rechkemmer G, Briviba K. Phytoestrogens modulate binding response of estrogen receptors alpha and beta to the estrogen response element. *J Agric Food Chem*, 2003, 51: 7632 - 7635

(收稿: 2010 - 12 - 24)