

体外牵张新生大鼠颅骨缝组织 培养液一氧化氮的表达变化*

仲伟洁¹, 张卫兵², 王 林^{2**}

(1 上海市口腔病防治院正畸科 上海 200031; 2 南京医科大学口腔医学院正畸科)

[摘要] 目的: 探讨一氧化氮(nitric oxide, NO)在机械力调节骨缝生长改建过程中早期表达变化的意义。方法: 取实验组和对照组体外器官培养的培养液, 用 NO 试剂盒, 检测牵张实验组和对照组新生大鼠颅骨骨缝组织在 1 h、6 h、24 h、48 h 生成 NO 的表达变化。实验组和对照组标本进行常规 HE 染色和组织形态学观察。结果: 实验组的骨缝被显著扩宽, 缝细胞计数结果显著高于对照组。实验组在受力 1 h 后, NO 含量开始明显增加, 到 48 h 最为明显。生成的 NO 量明显高于对照组。结论: NO 在机械力促进颅骨缝组织改建中具有重要的作用。

[关键词] 一氧化氮; 颅骨缝; 器官培养; 张力

[中图分类号] Q786

[文献标识码] A

[文章编号] 1003-1634(2008)07-0406-03

The regulating effect of tensile stress on producing NO in cranial suture of neonatal rats in vitro calvaria culture ZHONG Wei-jie, ZHANG Wei-bing, WANG Lin. The Orthodontic Department of Shanghai Stomatological Disease Center, Shanghai 200031, China.

[Abstract] **Objective:** To study the mechanism of NO in regulating the early growth of cranial suture under tensile stress. **Method:** The level of NO in the culture medium of experimental and control groups was calculated. HE stain was used to observe the sutural morphology change of the experimental and control groups. **Result:** The width of suture in the experimental groups is large than that of the control groups. The number of suture cells of experimental groups is obviously larger than that of control groups, especially osteoblast and mesenchymal cells. The level of NO in experimental group was higher than that of control group ($P < 0.05$). The level of NO increased after 1h in experimental group, and it kept increasing along with the time. It increased remarkably at 48h ($P < 0.01$). **Conclusion:** NO plays an important role in mechanical force-induced suture remodeling

[Key words] the level of NO; cranial suture; in vitro model system; tensile stress

正畸临床上常应用机械力调节骨缝生长来矫治颌面错殆畸形, 但是机体细胞是如何将力学信号转变为生化信号从而引发细胞增殖分化, 蛋白合成分泌及新骨沉积反应的机制并不清楚^[1,2]。有研究显示: 一氧化氮(Nitric oxide, NO)是一种可高度弥散的自由基。作为第二信使和神经递质, 是细胞-细胞间信息传递的重要调节因子, NO 在转导机械应力对骨组织的刺激、促进骨形成中具有重要的作用^[3]。有关机械张力对颅骨

缝组织生成 NO 调节作用的研究尚未见报道。本研究拟通过检测机械张力作用下新生大鼠颅骨缝组织生成 NO 的动态表达变化, 探讨 NO 在张应力调节骨缝生长中的作用。

材料和方法

1 颅骨缝体外牵张模型的建立

按照本课题组报道的实验方法^[4]建立新生大鼠颅骨缝体外牵张模型, 分别于培养 1 h、6 h、24 h、48 h 时收获组织标本。

2 NO 含量的测定

的变化[J]. 中华口腔医学杂志, 2000, 1 (35): 15-17.

338.

[3] Uitto VJ, Overall CM, McCulloch C. Proteolytic host cell enzymes in gingival crevice fluid [J]. Periodontology, 2003, 37 (1): 77-104.

[7] 周自永. 新编常用药物手册 [M]. 第 2 版. 北京: 金盾出版社, 1997.445.

[4] Palcanis KG, Larjava IK, Wells BR, et al. Elastase as an indicator of periodontal disease progression [J]. J Periodontol, 1992, 63: 237-242.

[8] Krane SM, Potts JT. Skeletal remodeling and factors influencing bone and bone mineral metabolism. In: Harrison's principles of internal medicine [M]. 8th ed. New York: McGraw-Hill, 1977. 2005-14.

[5] Eley BM, Cox SW. A 2-year longitudinal study of elastase in human gingival crevicular fluid and periodontal attachment loss [J]. J Clin Periodontol, 1996, 23: 681-692.

[6] 和璐, 曹采方, 沙月琴. 牙周炎治疗后龈沟液中弹性蛋白酶水平

收稿日期: 2008-03-31

收集 1 h、6 h、24 h、48 h 各个时间点培养后的 DMEM 培养液于 Ep 管中, 每个样本收集 0.3 ml, 标记后置于 -20°C 冻存。

采用硝酸还原酶法, 用 NO 试剂盒(南京聚力生物医学工程研究所提供)按说明书的操作步骤进行测定。

3 组织学观察

培养结束时, 颅骨缝组织标本于 10% 中性福尔马林中固定 10 h, 常规脱水、采用 10% EDTA 脱钙、包埋, 每个标本均沿牵张力方向作冠状切片, 将颅骨矢状缝组织石蜡块切片制成 $4\text{ }\mu\text{m}$ 连续切片。行 HE 常规染色, 光镜下观察颅骨矢状缝形态学改变, 进行计算机辅助组织形态学测量分析。采用 Olympus 研究显微镜对切片进行观察, 用 SPOT COD CCD 摄像头进行图像采集, 并用 Luzex F 型多功能图像分析仪进行分析。每组选用一张切片, 在高倍镜下 ($20\times$) 进行分析, 每张切片在骨棘交错相对处测量颅骨缝宽度, 按标准方格 ($300\text{ }\mu\text{m}\times 500\text{ }\mu\text{m}$) 对骨缝间细胞进行缝细胞计数(不分细胞的类型), 如图 1 所示。以 3 次测量值的均值作为该组在该时间段的实测值。

4 统计学分析

应用单因素方差分析(one-way ANOVA)比较对照组与实验组 NO 有无差别, q 检验分别比较两组不同时段 NO 的生成有无差别。



(← →)指缝扩张受力方向

图 1 颅骨缝组织形态测量 ($\times 200$)

结 果

1 一般观察

对照组和实验组均未见培养液浑浊, 培养液显微镜下观察证实无细菌污染。实验组培养液比对照组培养液颜色略深暗, 提示实验组代谢产物较多。

2 NO 测定

实验组及对照组大鼠颅骨缝的培养基中均能检测到 NO 的表达。骨缝组织受到牵张力后生成的 NO 明显高于对照组 ($P<0.05$) (见表 1)。与对照组相比, 实验组细胞在受力 1 h 后, NO 含量即开始明显增加 ($P<0.05$), 并随着时间延长而进一步增加, 以 48 h 最为明显 ($P<0.01$)。

表 1 机械张力作用不同时间对大鼠颅骨缝组织生成 NO 的影响

时间	($\mu\text{mol/L}$, $\bar{x}\pm s$)	
	对照组	实验组
1 h	59.94 $\pm$ 2.73	67.09 $\pm$ 1.30*
6 h	61.67 $\pm$ 0.39	70.64 $\pm$ 0.90*
24 h	67.71 $\pm$ 0.97	99.55 $\pm$ 1.56*
48 h	67.67 $\pm$ 1.28	112.69 $\pm$ 0.76*

*: 与对照组相比, $P<0.05$

3 组织学观察结果

实验组骨缝扩张, 缝细胞数目显著增加

HE 染色观察显示: 实验组可见骨缝显著扩张, 周围成骨细胞活跃, 毛细血管增生。实验 48 h 组骨缝宽度 ($291.99\pm 2.81\text{ }\mu\text{m}$, $n=4$) 与同期对照第 48 h 组 ($215.90\pm 4.79\text{ }\mu\text{m}$, $n=4$) 相比显著增加 ($P<0.01$)。缝细胞计数结果显示实验组 (184 ± 3 , $n=4$) 显著高于对照组 (106 ± 4 , $n=4$) ($P<0.01$)。对照组和实验组均未见组织坏死。(见图 2)

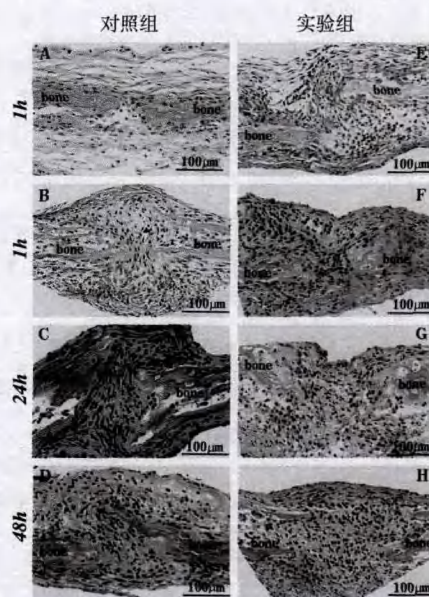


图 2 组织学观测结果

讨 论

一氧化氮(Nitric oxide, NO)是一种可高度弥散的自由基。作为第二信使和神经递质, 是细胞-细胞间信息传递的重要调节因子, 是一种细胞间信息交换载体。NO 参与广泛的生理功能调节, 如免疫和细胞毒性、感受神经传导及免疫防御机制等^[5]。目前的研究证实, NO 也与骨组织细胞的功能关系密切, 在骨改建过程中具有重要的自分泌或旁分泌功能^[3]。细胞因子、机械应力和雌激素的刺激作用, 将促进 NO 的生成^[6]。NO 通过调节破骨细胞的吸收活性和成骨细胞的增殖功能, 在维持骨形态和骨改建中起着重要作用^[7]。但是 NO 在机械应力调节骨缝生长改建过程中的作用未得到明确的认识。

NO 是一种不稳定、易扩散、半衰期极短 (3~5 s)、化学性质极为活泼的自由基。L-精氨酸(L-Arg)和活性氧分子在一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)催化, 还原型辅酶 E(NADPH)、黄素单核苷酸(FMN)、黄

素腺嘌呤二核苷酸(FAD)、四氢生物喋呤(BH)等因子辅助下,生成L-瓜氨酸(L-Cit),同时释放NO。依据NOS对 Ca^{2+} /CaM的依赖性不同,NOS分为原生型NOS(cNOS)和诱导型NOS(iNOS)。cNOS存在于内皮细胞、中枢和外周神经等细胞中,又分为脑型NOS(nNOS)和内皮细胞型NOS(eNOS)^[5]。NO没有专门的贮存及释放机制,生成后直接向四周扩散,透过细胞膜进入靶细胞发挥作用^[8]。NO半衰期极短,会迅速与水、氧、超氧自由基反应生成亚硝酸盐和硝酸盐,亚硝酸盐的总量是反应NO产量最好的指标。所以检测组织或体液内的NO含量,可以通过测定亚硝酸盐含量来间接测定。

本研究结果表明骨缝组织细胞受到机械牵张力后促进了NO的生成。机械牵张力对NO的调节作用在受力1h后即出现,并随着时间延长而进一步增加,以48h最为明显。机械张力对新生大鼠颅骨缝组织生成NO调节作用的机理可能是:机械张力致使插入颅骨缝两端骨缘的纤维受到张力牵拉,缝组织发生变形,产生流动剪切应力作用于骨缝细胞,通过刺激可溶性鸟苷酸环化酶,促进cGMP的合成来促进NO的生成^[9]。机械应力刺激生成的NO又与细胞内可溶性鸟苷酸环化酶的亚铁原卟啉上的铁离子结合,促进GTP生成cGMP,升高的cGMP刺激依赖cGMP的蛋白激酶,调节磷酸二酯酶和离子通道,导致细胞内 Ca^{2+} 增加和阳离子通道的开放, Ca^{2+} 由细胞外内流达到一定浓度,使Ca结合cNOS,cNOS随即被激活,数分钟内引起NO释放,从而引起机械生物信号转导通路的活化,调节细胞的生理功能^[10]。本实验中48h时NO含量最高,可能是随着受力时间的延长,各种细胞因子逐渐产生TNF- α ,IL-1,IFN- γ 等引起iNOS的活性增强所致。机械应力作用下NO的早期快速大量释放,可能是骨缝组织细胞将机械应力刺激转导入细胞,生成促进细胞增殖分化的生化信号分子的关键步骤。实验组NO的生成显著高于对照组,机械张力作用下实验组的缝组织细胞计数显著高于对照组的结果,两者高度相关。表明NO在骨缝组织的成骨细胞及成纤维细胞等的增殖及功能分化过程中起了重要的调控作用。在机械刺激作用下,NO合成迅速增高,外力在诱导骨生长过程中,NO起到了信号转导作用^[11,12]。机械力诱导NO合成是机械力诱导

PGE2合成的必要条件。而PGE2是参与力转导的第二信使体系,同时PGE2参与骨的代谢作用,促进骨的形成。NO可能是机械力引起骨反应的重要媒介^[7]。

NO与骨缝组织细胞功能关系密切。多种细胞因子、机械应激和激素等因素均可影响NO的生成。NO具有双重作用:生理情况下,广泛参与包括运动等系统的生理功能,但生成过多过长时间的NO则可产生细胞毒效应,成为自由基,造成多种损害。机械张力产生的一氧化氮含量到底受何种因素影响?在怎样的范围内促进骨缝的生长?这些问题仍有待进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] Mao J, Nah H. Growth and development: Hereditary and mechanical modulations[J]. Am J Orthod Dentofac Orthop, 2004, 125: 676-689.
- [2] Mao J. Mechanobiology of craniofacial sutures[J]. Dent Res, 2002, 81: 810-816.
- [3] Fox SW, Chambers TJ, Chow JWM. Nitric oxide is an early mediator of the increase in bone formation by mechanical stimulation [J]. Am J Physiol, 1996, 270: 955-960.
- [4] 仲伟洁, 张卫兵, 马俊青, 等. 新生大鼠颅骨缝体外牵张模型的建立[J]. 口腔医学, 2006, 26: 60-61.
- [5] 刘景生. 细胞信息与调控[M]. 第2版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2004: 339-342.
- [6] Nomura S, Takano, Yamamoto T. Molecular events caused by mechanical stress in bone[J]. Matrix Biol, 2000, 19: 91-96.
- [7] Chae HJ, Park RK, Chung HT, et al. Nitric oxide is a regulator of bone remodelling[J]. J Pharm Pharmacol, 1997, 49: 897-902.
- [8] Ralston SH. The Michael Mason Prize Essay. Nitric oxide and bone: what a gas! [J]. Br J Rheumatol, 1997, 36: 831-838.
- [9] Riancho JA, Salas E, Zarrabeitia M T, et al. Expression and functional role of nitric oxide synthase in osteoblast-like cells [J]. J Bone Miner Res, 1995, 10: 439-446.
- [10] cAllister TN, F rango s JA. Steady and transient fluid shear stress stimulate NO release in osteoblasts through distinct biochemical pathways[J]. J bone Miner Res, 1999, 4: 930-936.
- [11] Rubin J, Rubin C, Jacobs CR. Molecular pathways mediating mechanical signaling in bone[J]. Gene, 2006, 367: 1-16.
- [12] McGarry JC, Maguire P, Campbell VA, et al. Stimulation of nitric oxide mechanotransduction in single osteoblasts using atomic force microscopy[J]. Orthop Res, 2007, 26: 513-521.

收稿日期: 2008-04-06

书 讯

由北京大学口腔医院耿温琦教授主编的《下颌阻生智齿》第2版,已于近期由人民出版社出版。本书详尽介绍了各种下颌阻生智齿拔出方法及并发症的防治,共29章,60余万字,400余幅

插图,内容翔实,图文并茂,理论结合实践,指导性强,可供口腔专业大专院校实习医生及各级临床医生在医、教、研工作中参考应用。定价59元,各地新华书店有售。