文章编号:1000-5404(2012)08-0781-04

论著

胰岛素样生长因子-1在骨性Ⅲ类错殆畸形中的表达

陈允嘉[1*],李 艳[1*],王豫蓉[1],秘双燕[1],吴增波[1],王 强[1],颜 婕[2] (400015 重庆,重庆医科大学附属口腔医院正畸科[1];400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所医教科技部[2])

[摘要] **目的** 研究在下颌骨发育过度导致的骨性Ⅲ类错殆畸形患者中,胰岛素样生长因子-1(IGF-1)基因的表达,探讨IGF-1基因表达与下颌骨生长的关系。**方法** 选取骨性Ⅲ类错殆畸形患者27例,骨性Ⅰ类患者(包括个别正常殆)27例,应用荧光定量PCR技术和酶联免疫吸附剂测定(ELISA)技术研究下颌骨中IGF-1基因的表达变化。**结果** RT-PCR检测结果显示,骨性Ⅲ类错殆畸形组中IGF-1 mRNA的表达量为(5.541 0±2.044 7)μg/μl,骨性Ⅰ类组中IGF-1 mRNA的表达量为(1.282 1±0.273 1)μg/μl,2组比较具有统计学差异($P<0.05$)。根据IGF-1基因光密度值与浓度关系曲线,得回归系数0.998。ELISA检测结果显示,骨性Ⅲ类错殆畸形组中IGF-1蛋白浓度为(84.125 9±29.294 7)ng/L,骨性Ⅰ类组中IGF-1蛋白浓度为(22.406 4±4.931 2)ng/L,2组相比具有显著差异($P<0.05$)。**结论** 下颌骨生长量越大,IGF-1基因mRNA和蛋白表达越高。

[关键词] 骨性Ⅲ类错殆;胰岛素生长因子-1;下颌骨;遗传因素
[中图法分类号] R181.24;R394.3;R782.23 [文献标志码] A

Expression of insulin-like growth factor-1 in bony class Ⅲ malocclusion

Chen Yunjia[1], Li Yan[1], Wang Yurong[1], Mi Shuangyan[1], Wu Zengbo[1], Wang Qiang[1], Yan Jie[2] ([1]Department of Orthodontics, Affiliated Stomatology Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400015; [2]Devision of Medical Affairs and Teaching & Scientific Research Affair, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the expression of IGF-1 in bony class Ⅲ malocclusion patients and its relationship with growth of mandible. **Methods** Twenty-four bony class Ⅲ malocclusion patients and 27 bony class Ⅰ malocclusion patients were included in this study. Expression of IGF-1 in mandible tissue was detected by RT-PCR and ELISA, respectively. **Results** RT-PCR showed that the expression level of IGF-1 mRNA was significantly higher in bony class Ⅲ malocclusion patients than in bony class Ⅰ malocclusion patients (5.541 0±2.044 7 μg/μl *vs* 1.282 1±0.273 1 μg/μl, $P<0.05$). The regression factor was 0.998, which was calculated according to the correlation curve for IGF-1 optical density value and its concentration. ELISA showed that the expression level of IGF-1 protein was significantly higher in bony class malocclusion patients than in bony class Ⅰ malocclusion patients (84.125 9±29.294 7 ng/L *vs* 22.406 4±4.931 2 ng/L, $P<0.05$). **Conclusion** The more the mandible grows, the higher the expression level of IGF-1 is, which indicates that IGF-1 plays an important role in growth of mandible condyloid cartilage.

[**Key words**] class Ⅲ malocclusion; IGF-1; mandible; genetic factor

Supported by the Key Project of Chongqing Municipal Health Bureau(2009-3-32). Chen Yunjia and Li Yan are the first author who contributed equally to the article. Corresponding author: Wang Yurong, E-mail: rywmin66@yahoo.com.cn

下颌骨生长过度导致的骨性Ⅲ类错殆畸形是临床较为常见的一类错殆畸形,其病因复杂,遗传因素占主导地位[1-3]。下颌骨髁状突的生长改建是与下颌骨生长直接相关的要素之一,受全身因素的调节和局部生长因子的反馈作用[4-5]。胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor-1,IGF-1)作为生长激素的介质,在机体的生长发育中发挥着重要作用,尤其对于软骨生长的调节作用较为突出[5-7]。Suzuki等[8]在成熟的大鼠中研究发现,注入IGF-1基因的颞下颌关节中,髁状突软骨层的厚度增加,通过活跃成骨的过程和诱导密质骨形成的方式加速髁状突软骨内成骨的速度。Yonemitsu等[9]的实验证实:IGF-1基因能加速髁状突软骨成骨的速度和阻止髁状突软骨细胞凋亡,因此可将其作为观察下颌骨生长的一个指标。Yokota等[10]的研究发现,在大鼠下颌骨髁状突的未分化间质细胞层中检测到IGF-1基因的表达,并且证实IGF-1基因是调节细胞凋亡的一个重要内源性因素。这些研究表

[基金项目] 重庆市卫生局重点项目(2009-3-32)
* 同等贡献者
[通信作者] 王豫蓉,E-mail:rywmin66@yahoo.com.cn

明 IGF-1 基因与下颌骨的生长密切相关,是调节软骨增殖、分化,促进软骨基质合成的一个重要的生长因子,但有关 IGF-1 基因在下颌骨细胞增长过度导致的骨性Ⅲ类错殆畸形人群中的表达情况尚少见报道。本研究应用荧光定量 PCR 技术和酶联免疫吸附剂测定(ELISA)法分别从核酸和蛋白的水平研究 IGF-1 基因在骨性Ⅲ类错殆畸形患者和骨性Ⅰ类错殆畸形患者中的表达,探讨 IGF-1 基因与下颌骨生长的关系。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2008 年 3 月至 2010 年 10 月就诊于重庆医科大学附属口腔医院正畸科 54 例错殆畸形患者,其中包括骨性Ⅲ类错殆畸形患者 27 例;骨性Ⅰ类,单纯牙性错殆畸形患者(个别正常殆)27 例。

试验组病例选择标准:患者为汉族人群,无异族通婚史、不良习惯、替牙障碍,颌面部损伤史、营养不良,肝脏疾病、全身疾病以及其他遗传病史。试验组中上颌骨生长正常,下颌骨生长过度,Ⅲ类骨面型,骨性Ⅲ类错殆畸形;存在 3 代或 3 代以上家族遗传史;磨牙近中关系;下颌不能后退至前牙对刃位;头颅侧位片示∠ANB < -1°,∠SNB > 82.4°,∠SNA 正常。

对照组选择标准:中上下颌骨生长正常,骨性Ⅰ类关系;磨牙中性关系;头颅侧位片示前后颅底线距、颅底角、下颌角、前后面高比、上颌大小形态正常;2° < ANB < 4°(包括牙性错殆患者与个别正常殆)。

1.2 标本处理

于重庆医科大学附属口腔医院检验科采取试验组和对照组新鲜血液各 4 ml(抗凝血 2 ml,无任何处理血液 2 ml),将 2 ml 抗凝血立即分别分装成 0.25 ml/个,加入 TRIpure LS Reagent 提取试剂各 0.75 ml,上下颠倒混匀后置于漩涡混合器涡旋振荡混匀,室温静置 10 min 后转移至 -80 ℃超低温冰箱储存,待后续实验使用。将未经任何处理的 2 ml 血液室温静置 1 h 后,3 500 r/min 离心 5 min,吸取上清液至干净 1.5 ml EP 管(约 500 ml),封口膜封口,放置 -80 ℃超低温冰箱保存备用。

1.3 主要试剂

TRIpure LS Reagent(RP1101)购自北京 BioTeke Corporation。SYBR Premix Ex *Taq*™ Ⅱ(Perfect Real Time)(DRR081S),PrimeScript RT reagent Kit With gDNA Eraser(Perfect Real Time)(DRR047S),250 bp DNA Ladder Marker(D515)购自 TaKaRa 公司。人 IGF-1 ELISA 试剂盒(1R423s)购自美国 RB 公司。

1.4 RT-PCR 检测 IGF-1 mRNA 的表达

1.4.1 RNA 的提取 血液为抗凝血标本,参照 TRIpure LS Reagent 试剂说明书,常规提取血液中的总 RNA。应用紫外分光光度仪测定 $D(260)/D(280)$ 的比值,若比值大于 1.7,说明符合纯度要求。应用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。

1.4.2 逆转录和 PCR 扩增 提取的总 RNA 按照 TaKaRa 公司 RT-PCR 试剂盒进行逆转录和 PCR 扩增反应。逆转录反应的条件为 42 ℃ 2 min;37 ℃ 5 min;85 ℃ 5 s;根据 GenBank 提供的信息,由上海宝生物公司合成引物,人 IGF-1 基因(GenBank:序列号 NM_000618.3),选取人 GAPDH 基因(GenBank:序列号 NM_002046)作为内参对照,同样设计引物。人 IGF-1 的上游引物:5′-ATGTCCTCCTCGCATCTCTTCT-3′,下游引物:5′-ATAAAAGCCCCTGTCTCCACAC-3′,扩增产物长度为 138 bp。hGAPDH 的上游引物:5′-CTTTGGTATCGTGGAAGGACTC-3′,下游引物:5′-GTAGAGGCAGGGATGATGTTCT-3′,扩增产物长度为 132 bp。PCR 反应体系中含有 Ex *Taq*™ Ⅱ(Perfect Real Time) 10 μl;上下游引物各 0.4 μl;ROX Reference Dye(50 ×) 0.4 μl;模板 cDNA 2 μl;dH_2O 6.8 μl。PCR 反应条件为 95 ℃ 10 s;95 ℃ 5 s;55 ℃ 30 s,共 40 个循环,采用实时荧光定量 PCR 仪自动生成扩增曲线和溶解曲线,根据曲线的情况来确定反应产物的单一性。设定阈值为 0.05,分别读取各个样本的实时荧光定量 PCR 扩增曲线所对应的循环次数。目的基因相对对照组中的表达变化量为 $Ratio = 2^{-\triangle\triangle Ct}$。

$\triangle\triangle Ct$ = 试验组$_{average(CtIGF-1 - CtGAPDH)}$ - 对照组$_{average(CtIGF-1 - CtGAPDH)}$

1.5 ELISA 方法检测 IGF-1 蛋白的表达

血液采用未加抗凝剂处理的血清标本,采用双抗体夹心 ELISA 检测方法,严格按照试剂说明书进行操作,实验设 3 个复孔。向酶标板中分别加入浓度为 0、0.2、0.8、2、4、8 ng/ml 的标准品 25 μl,血清样品 25 μl,编号并记录;再向酶标板中每孔加入 25 μl Biotin anti IGF-1,混匀 30 s,37 ℃ 30 min;将板内反应混合液体甩净,每孔加入 350 μl 1 × 洗涤液,洗涤且重复 3 次。加入 50 μl HRP,30 s,37 ℃ 30 min;洗板重复 3 次;再分别加入 50 μl TMB 显色液,10 s,37 ℃ 15 min。加入 50 μl 终止液,30 s。30 min 内在酶标仪 450 nm 处读光密度值。以读取的光密度值为纵坐标,标准品浓度为横坐标,EXCEL 绘制标准曲线。

1.6 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 16.0 统计软件。先行方差齐性检验,若方差齐,采用独立配对 t 检验;若方差不齐,采用秩和检验,IGF-1 蛋白表达的数据应用组间独立 t 检验。

2 结果

2.1 试验组与对照组性别、年龄基本情况

试验组 27 例,其中男性 13 例,平均年龄 15.56 岁,女性 14 例,平均年龄 15.02 岁。对照组 27 例,其中男性 15 例,平均年龄 16.15 岁,女性 12 例,平均年龄 15.95 岁。经统计学分析,2 组性别、年龄均无显著性差异($P > 0.05$),说明本研究搜集的 2 组资料具有较好的可比性。

2.2 RAN 提取与 PCR 扩增

1% 琼脂糖凝胶电泳图可以见到 3 条清晰的条带:28S、18S 和 5S。提取 RNA 经过紫外分光光度计测得 $D(260)/D(280)$ 的比值在 1.7 ~ 2.0 之间,表明 RNA 无降解,质量尚可。在不同的错殆畸形患者中,IGF-1 基因的荧光定量扩增曲线呈 S 型曲线的趋势(图 1),溶解曲线呈现单峰,排除了非特异性扩增和引物二聚体的出现(图 2)。

2.3 IGF-1 mRNA 和蛋白的表达

试验组中 IGF-1 mRNA 的表达量为(5.541 0 ± 2.044 7) μg/μl,血清 IGF-1 蛋白浓度为(84.125 9 ± 29.294 7) ng/L;对照组中 IGF-1 mRNA 的表达量为(1.282 1 ± 0.273 1) μg/μl,血

清 IGF-1 蛋白浓度为(22.406 4 ± 4.931 2) ng/L。试验组中 IGF-1 mRNA 的表达量明显高于对照组($P<0.05$)。根据 IGF-1 基因光密度值与浓度关系曲线,得回归系数 0.998。试验组中血清 IGF-1 蛋白浓度明显高于对照组血清 IGF-1 蛋白浓度($P<0.05$)。

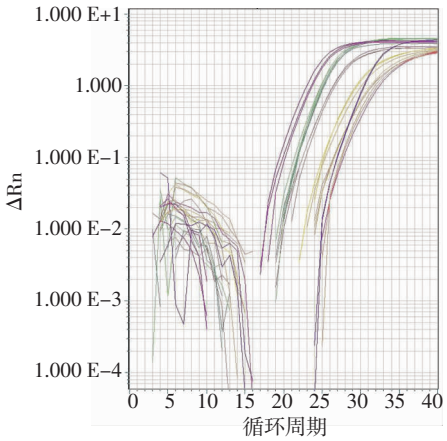


图 1 IGF-1 基因扩增曲线

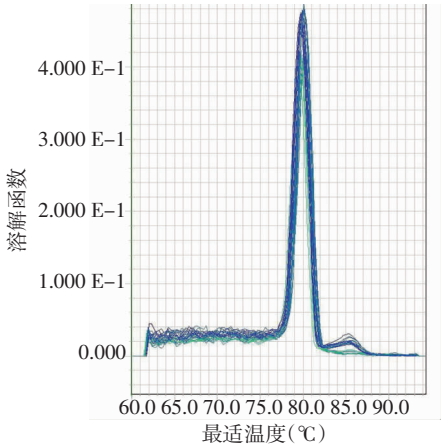


图 2 IGF-1 基因的熔解曲线

3 讨论

胰岛素样生长因子-1(IGF-1)作为一个多功能刺激因子,在调节下颌骨髁状突软骨的生长中发挥着重要作用[9-11]。IGF-1 基因主要由肝脏循环产生和分泌,在其他脏器中也存在少量 IGF-1 的表达,其受体 IGF-1R 基因编码位于第 15 号染色体,与 IGF-1 的结合通过不同调节信号途径介导发生不同免疫反应。IGF-1 基因可以分别通过与 T 淋巴细胞表面的Ⅰ型受体结合而参与生长调节和通过刺激 T 淋巴细胞的生长、趋化以及调控辅助性 T 细胞(Th)、抑制性 T 细胞(Ts)的产生变化等引起免疫反应。研究证实,IGF-1 基因可以通过促进髁状突软骨未分化间质细胞层的细胞增值、分化及分泌纤维和基质,加速软骨成骨[8,10]。Barton 等[12]在研究中由于 IGF-1 对于肌肉、骨骼和软骨的特殊作用,而将 IGF-1 作为评价下颌骨生长发育的一个指标。亦有研究将 IGF-1 作为基因治疗颞下颌关节疾病的候选基因,源于它可以对软骨基质的降低存在抑制作用和对抗其他因子(如 IL-1)的破骨作用[13],这两方面的调节作用于软骨细胞产生,对软骨细胞的产生具有协同促进作用。

本研究检测目的基因 IGF-1 对软骨的生长发育调节有明显作用,通过血液样本 RNA 提取、逆转录与 PCR 扩增等实验手段能够反映 IGF-1 的表达;下颌髁突软骨成骨是下颌的生长发育的重要方式之一。因此可以将 IGF-1 作为观察下颌骨生长的一个指标[9]。如果试验能以下颌骨作为标本,检验其中 IGF-1 的表达与下颌骨发育异常的关系,将会更加具有说服力。但取得下颌骨标本需要进行有创手术操作,临床上有一定难度。

本试验 RT-PCR 检测结果显示,骨性Ⅲ类错𬌗畸形组的 IGF-1 mRNA 的表达量高于骨性Ⅰ类组。推测下颌骨的生长量越大,IGF-1 mRNA 的表达量越高,下颌骨髁状突的生长量受 IGF-1 mRNA 的表达的调控,可能是 IGF-1 基因通过调节髁状突软骨未分化细胞层的相关细胞来发挥作用。有研究对大鼠的下颌骨髁状突进行研究,推测 IGF-1 可能通过调节成软骨细胞、幼稚细胞[14]、滑膜细胞和成纤维细胞的分化来发挥促软骨成骨的效应[15]。ELISA 检测 IGF-1 蛋白的结果显示,IGF-1 蛋白在骨性Ⅲ类错𬌗畸形中的表达显著高于骨性Ⅰ类组,推断可能 IGF-1 作为一种介质,通过调节 T 淋巴细胞的增生、分化及其表面的 IGF-1R(Ⅰ型)的表达来促使生长激素(GH)发挥生长作用[16],达到促进机体的组织生长的目的。还有可能是调节了 DNA 的合成,蛋白多糖和Ⅱ型骨胶原的分泌[17],来达到软骨生长量的增加,其具体机制有待进一步研究探讨。ELISA 检测 IGF-1 蛋白的结果与 RT-PCR 法观察 mRNA 表达的结果一致,提示人血清中 IGF-1 蛋白的浓度可能与下颌骨的生长量的大小呈正相关。

上下颌骨的成骨方式有一定差异,上颌骨的生长发育不包括软骨成骨。因此本研究仅涉及 IGF-1 对下颌骨的影响。IGF-1 基因可作为成骨细胞生物学表型研究的指标[18],能加速髁状突软骨成骨的速度和阻止髁状突软骨细胞凋亡,因此可将其作为观察下颌骨生长的一个指标[9]。

综上所述,本研究证实 IGF-1 基因在人下颌骨髁状突的生长中可能发挥较重要的调节作用,具体的调节机制尚待探究。

参考文献:

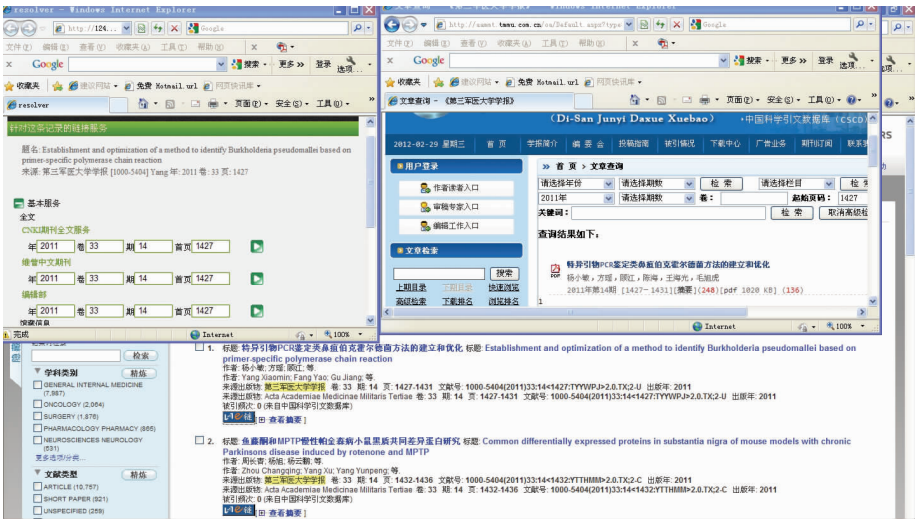
[1] 傅民魁. 口腔正畸学[M]. 5 版. 北京:人民卫生出版社, 2007:30-42.

[2] Normando D, Faber J, Guerreiro J F, *et al*. Dental occlusion in a split Amazon indigenous population: genetics prevails over environment[J]. PLoS ONE, 2011, 6(12): e28387.
[3] Xue F, Wong R W, Rabie A B. Genes, genetics, and Class III malocclusion[J]. Orthod Craniofac Res, 2010, 13(2): 69-74.
[4] Petrovic A G. Mechanisims and regulation of mandibular condylar growth[J]. Acta Morphol Neerl Scand, 1972, 10(1): 25-34.
[5] Davies L C, Blain E J, Gilbert S J, *et al*. The potential of IGF-1 and TGFbeta1 for promoting "adult" articular cartilage repair: an *in vitro* study[J]. Tissue Eng Part A, 2008, 14(7): 1251-1261.
[6] Uebersax L, Merkle H P, Meinel L. Insulin-like growth factor I releasing silk fibroin scaffolds induce chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells[J]. J Control Release, 2008, 127(1): 12-21.
[7] 司芹芹. 胰岛素样生长因子-1与骨质疏松关系的实验研究[J]. 中外医疗, 2008, (22): 6-7.
[8] Suzuki S, Itoh K, Ohyama K. Local administration of IGF-I stimulates the growth of mandibular condyle in mature rats[J]. J Orthod, 2004, 31(2): 138-143.
[9] Yonemitsu I, Muramoto T, Soma K. The influence of masseter activity on rat mandibular growth[J]. Arch Oral Biol, 2007, 52(5): 487-493.
[10] Yokota T, Shimokawa H, Shibata S, *et al*. Insulin-like growth factor I regulates apoptosis in condylar cartilage[J]. J Dent Res, 2008, 87(2): 159-163.
[11] 于晓兵, 赵德伟, 王铁男, 等. IGF-1在股骨头再造关节软骨化生中的作用[J]. 中国临床解剖学杂志, 2010, 28(2): 188-192.
[12] Barton E R, Crowder C. Growth Factor Targets for Orthodontic Treatments[J]. Semin Orthod, 2010, 16(2): 128-134.
[13] Gooch K J, Blunk T, Courter D L, *et al*. IGF-I and mechanical environment interact to modulate engineered cartilage development[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 286(5): 909-915.
[14] Maor G, Hochberg Z, Silbermann M. Insulin-like growth factor I accelerates proliferation and differentiation of cartilage progenitor cells in cultures of neonatal mandibular condyles[J]. Acta Endocrinol (Copenh), 1993, 128(1): 56-64.
[15] 王晖, 崔一民, 朱俊峰, 等. 力学刺激联合诱导因子对组织工程软骨的影响[J]. 中国修复重建外科杂志, 2011, 25(11): 1377-1382.
[16] Prasadam I, van-Gennip S, Friis T, *et al*. ERK-1/2 and p38 in the regulation of hypertrophic changes of normal articular cartilage chondrocytes induced by osteoarthritic subchondral osteoblasts[J]. Arthritis Rheum, 2010, 62(5): 1349-1360.
[17] Messai H, Duchossoy Y, Khatib A M, *et al*. Articular chondrocytes from aging rats respond poorly to insulin-like growth factor-1: an altered signaling pathway[J]. Mech Ageing Dev, 2000, 115(1/2): 21-37.
[18] 张立智, 张先龙, 王琦, 等. 骨关节炎软骨下骨的成骨细胞生物学表型研究[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(10): 1003-1007.

(**收稿**:2011-11-17;**修回**:2012-01-04)
(编辑 张 维)

《第三军医大学学报》通过 Web of Knowledge 平台检索并获取全文

日前,我刊编辑部通过中国科学院获悉《第三军医大学学报》(简称《学报》)不仅可在 Web of Knowledge 平台检索引文和题录数据,还可通过全文链接直接到《学报》编辑部网站获取全文。这种新的全文检索方式,为 Web of Knowledge 的国内外用户提供便利的《学报》全文服务,为国内科技工作者研究国际化提供了一条新的路径,也为《学报》扩大海外知名度和利用率奠定基础。



通过 Web of Knowledge 获取《第三军医大学学报》全文示意图

早在1989年,中国科学院国家科学图书馆创立中国科学引文数据库(Chinese Science Citation Database,简称 CSCD)之初,《学报》即被首批收录其中。2007年,中国科学院与美国汤姆森科技信息集团 Thomson Reuters Scientific 合作向全球推出中国科学引文数据库 CSCD。CSCD 与 Science Citation Index(SCI)、Social Science Citation Index(SSCI)等一起有机地集成在汤姆森路透 Web of Knowledge(以前称 ISI Web of Knowledge)平台,成为该平台上第一个非英文语种的数据库。此后,双方一直在积极努力进行数据整合和系统升级改造工作。而今,《学报》成为首批可通过 CSCD 直接链接到编辑部网站获取全文的期刊之一。

汤姆森路透集团的网络数据库——Web of Knowledge,是全球首屈一指的学术研究及引文数据来源,可供存取全球最大的引文索引数据库,包括 Web of Science,包含了超过12 000种高影响力的期刊并收录逾百年的研究成果,还有全球超过110 000种会议论文集。