



# 细胞因子在颞下颌关节 紊乱病中的作用

The Roles of Cytokines in Temporomandibular Disorders

方平科



高等教育出版社

HIGHER EDUCATION PRESS



# 细胞因子在颞下颌关节 紊乱病中的作用

The Roles of Cytokines in Temporomandibular Disorders

方平科



高等教育出版社

HIGHER EDUCATION PRESS

## 图书在版编目(CIP)数据

细胞因子在颞下颌关节紊乱病中的作用/方平科.  
北京:高等教育出版社,2002.12  
ISBN 7-04-009401-0

I. 细... II. 方... III. ①颞下颌关节综合征:功能性疾病-病因-研究②细胞因子-作用-研究

IV. R782.6

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2002)第 089007 号

出版发行	高等教育出版社	购书热线	010-64054588
社 址	北京市东城区沙滩后街 55 号	免费咨询	800-810-0598
邮政编码	100009	网 址	<a href="http://www.hep.edu.cn">http://www.hep.edu.cn</a>
传 真	010-64014048		<a href="http://www.hep.com.cn">http://www.hep.com.cn</a>

经 销 新华书店北京发行所  
排 版 高等教育出版社照排中心  
印 刷 高等教育出版社印刷厂

开 本	850×1168 1/32	版 次	2002 年 12 月第 1 版
印 张	3.875	印 次	2002 年 12 月第 1 次印刷
字 数	90 000	定 价	8.60 元
插 页	9		

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换。

**版权所有 侵权必究**

## 作者简介



方平科,男,1970年12月出生。1993年毕业于河南大学医学院,获口腔医学学士学位。1996年毕业于武汉大学医学院,获口腔颌面外科学硕士学位。1999年毕业于北京大学医学部,获口腔颌面外科学博士学位。同年8月,赴美留学。现在哈佛医学院附属马萨诸塞州总医院从事肾脏疾病的研究工作。

通信地址:Ping Ke Fang, Renal Unit, CNY8, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, 149 13<sup>th</sup> Street, Charlestown, MA 02129, U.S.A.

## 导师简介 (1)



马绪臣,1945年11月17日生,山东惠民县人。1970年北京大学医学部口腔系毕业,1984年获北京大学医学部博士学位。现为北京大学医学部口腔医学院教授、博士研究生导师、国际牙医研究会会员、国际牙医师学院院士、《国际牙颌面放射杂志》及《中华口腔医学杂志》等9本专业杂志编委,中华口腔医学会颞下颌关节病学组组长、口腔颌面放射专业委员会主任委员和老年口腔医学专业委员会副主任委员。从事颞下颌关节病及口腔颌面影像学的临床、教学及研究工作,对颞下颌关节病的诊断、治

疗及相关基础理论有广泛深入的研究,1985年“颞下颌关节紊乱综合征的X线诊断研究”一组论文获卫生部科技成果乙等奖,1993年“颞下颌关节紊乱综合征病因、诊断及治疗的综合研究”获卫生部科技成果三等奖,1995年获光华科技三等奖,1996年获国家教委科技进步(甲)三等奖,1999年获卫生部科技成果三等奖。国内外发表论文120余篇,主编专著3部,参加专著编写20余部。1993年获“做出突出贡献的中国博士学位获得者”称号,并开始享受国务院颁发的政府特殊津贴,1996年获卫生部有突出贡献中青年专家称号。

## 导师简介(2)



马大龙,1952年生。1977年广西医学院医疗系毕业,1981年北京大学医学部免疫学专业毕业,获硕士学位,1983年至1985年在德国海德堡大学免疫学研究所进修,1989年获北京大学医学部免疫专业博士学位。从1981年起,历任助教、讲师、副教授和教授。现担任北京大学医学部基础医学院免疫学系教授、博士研究生导师、北京大学人类疾病基因研究中心主任、北京大学

医学部基础医学院副院长,主要社会兼职包括国家863计划生物与现代农业专家委员会委员、中国免疫学会基础免疫分会主任委员、北京生物工程学会副理事长、科技型中小企业技术创新基金专家咨询委员会副主任等。10年来共发表论文及综述130余篇,参加著作、教材编写近10部。2001年获中国高校自然科学一等奖。

## 内容提要

本论文首先对颞下颌关节紊乱病关节液中白细胞介素-1受体拮抗剂、白细胞介素-10和转化生长因子- $\beta$ 1的水平进行了检测,旨在进一步揭示颞下颌关节紊乱病的病因及发病机制。继之,我们首次开展了重组人转化生长因子- $\beta$ 1促进颞下颌关节髁状突软骨缺损修复的实验研究。

人类基因治疗是20世纪80年代末期兴起的重要研究领域之一,而人们在裸质粒DNA治疗骨关节病方面的研究,尚未见报道。为此,我们率先比较系统地开展了具有治疗作用的裸质粒DNA治疗骨关节病的实验研究——重组人血管内皮生长因子真核表达质粒及重组人突变型TGF- $\beta$ 1真核细胞表达质粒促进颞下颌关节髁状突软骨缺损修复。

## 缩略语表

英文缩略语	英文全名	中文全名
AP-1	activator protein-1	激活蛋白 - 1
bFGF	basic fibroblast growth factor	碱性成纤维生长因子
BSA	bovine serum albumin	牛血清白蛋白
CIA	collagen-induced arthritis	胶原诱导的关节炎
ECM	extracellular matrix	细胞外基质
EGF	epidermal growth factor	表皮生长因子
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附测定
FACS	flow-activated cell sorting	流式激活的细胞分类计数
FGF-1	fibroblast growth factor-1	成纤维细胞生长因子 - 1
Flt-1	fms-like tyrosine kinase	fms 样酪氨酸激酶
FN	fibronectin	纤维连接蛋白
G-CSF	granulocyte colony stimulating factor	粒细胞 - 集落刺激因子
GM-CSF	granulocyte -macrophage colony stimulating factor	粒巨细胞 - 集落刺激因子
IFN- $\gamma$	interferon- $\gamma$	干扰素 - $\gamma$
IGF	insulin-like growth factor	胰岛素样生长因子
IGFBPs	insulin-like growth factor binding proteins	胰岛素样生长因子结合蛋白
IGFR	insulin-like growth factor receptor	胰岛素样生长因子受体

IL-1	interleukin-1	白细胞介素-1
IL-1 ra	interleukin-1 receptor antagonist	白细胞介素-1受体拮抗剂
IL-R	interleukin-1 receptor	白细胞介素-1受体
IRAP	interleukin-1 receptor antagonist protein	白细胞介素-1受体拮抗蛋白
LIF	leukemia inhibitory factor	白血病抑制因子
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1	单核细胞趋化蛋白-1
MMPs	matrix metalloproteinases	基质金属蛋白酶
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide	四甲基偶氮唑盐
NO	nitric oxide	一氧化氮
OSM	oncostatin M	肿瘤抑素 M
PA	plasminogen activator	纤溶酶原激活素
PAI-1	plasminogen activator inhibitor-1	纤溶酶原激活物抑制剂-1
PD-ECGF	platelet-derived endothelial cell growth factor	血小板衍化内皮细胞生长因子
PDGF	platelet-derived growth factor	血小板衍化生长因子
PF-4	platelet factor -4	血小板因子-4
PGE <sub>2</sub>	prostaglandin E <sub>2</sub>	前列腺素 E <sub>2</sub>
RT-PCR	reverse transcription-polymerase chain reaction	反向转录-多聚酶链反应
Sandwich-ELISA	Sandwich enzyme-linked immunosorbent assay	夹心法酶联免疫吸附测定
TGF- $\alpha$	transforming growth factor- $\alpha$	转化生长因子- $\alpha$
TGF- $\beta$	transforming growth factor- $\beta$	转化生长因子- $\beta$
TIMP	tissue inhibitor of MMP	组织基质金属蛋白酶抑制剂
TMD	temporomandibular disorders	颞下颌关节紊乱病
TMJ ID	temporomandibular joint internal derangement	颞下颌关节结构紊乱
TMJ OA	temporomandibular joint osteoarthritis	颞下颌关节骨关节病
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor- $\alpha$	肿瘤坏死因子- $\alpha$



---

VEGF	vascular endothelial growth factor	血管内皮生长因子
VPF	vascular permeability factor	血管通透性因子

# 前 言

颞下颌关节紊乱病(temporomandibular disorders, TMD)病因、发病机制及治疗,多年来一直是口腔医学界研究的重点问题。近年来,随着各临床及基础学科的迅猛发展,人们对于颞下颌关节紊乱病的病因、发病机制了解得远较以前深入;在临床治疗上,所采取的方法和手段亦远较以前先进。然而,目前人类在该疾病病因实质方面的认识仍存在一定的局限性,因而也限制了临床治疗工作的发展。

近年来,越来越多的研究成果表明,虽然颞下颌关节在其解剖学上与身体其他部位的大滑膜关节存在差别,但是,在更多的情况下,颞下颌关节作为一种滑膜关节,遵循着与其他滑膜关节相同的生物学法则。因此,不能完全孤立地对颞下颌关节进行研究。有关其他滑膜关节骨关节病的理论及研究,可以应用到颞下颌关节骨关节病的研究上;同样,颞下颌关节骨关节病的理论及研究成果也可以丰富和完善其他关节的研究内容。

在此前提下,本学位论文首先对颞下颌关节紊乱病关节液中白细胞介素-1受体拮抗剂、白细胞介素-10和转化生长因子- $\beta$ 1的水平进行了检测。结果表明,人类颞下颌关节骨关节病患者的关节液中仅存在微量的转化生长因子- $\beta$ 1。微量表达的转化生长因子- $\beta$ 1等免疫抑制或调节性细胞因子不足以抑制软骨的

降解和促进软骨的修复,可能是颞下颌关节骨关节炎发病的重要因素之一。因此,我们首次开展了重组人转化生长因子- $\beta 1$ 促进颞下颌关节髁状突软骨缺损修复的实验研究。

人类基因治疗是20世纪80年代末期兴起的重要研究领域之一。它的出现,为人类克服和战胜疾病提供了一个新的武器。目前基因治疗研究主要集中在肿瘤性疾病、病毒性感染和遗传性疾病等领域,而人们在裸质粒DNA治疗骨关节炎方面的研究,尚未见报道。为此,我们率先比较系统地开展了具有治疗作用的裸质粒DNA治疗骨关节炎的研究——重组人血管内皮生长因子<sub>121</sub>真核表达质粒及重组人突变型TGF- $\beta 1$ 真核细胞表达质粒促进颞下颌关节髁状突软骨缺损修复。

本学位论文由如下几部分组成:

- 一、颞下颌关节紊乱病关节液中转化生长因子- $\beta 1$ 的检测;
- 二、颞下颌关节紊乱病关节液中白细胞介素-1受体拮抗剂和白细胞介素-10的检测;
- 三、重组人TGF- $\beta 1$ 促进颞下颌关节髁状突软骨全层缺损修复的实验研究;
- 四、重组人血管内皮生长因子<sub>121</sub>真核表达质粒促进颞下颌关节软骨全层缺损修复的实验研究;
- 五、重组人突变型TGF- $\beta 1$ 真核细胞表达质粒对颞下颌关节髁状突软骨全层缺损修复的影响;
- 六、附录 重组人突变型TGF- $\beta 1$ 真核细胞表达质粒的构建及表达。

## 摘 要

颞下颌关节紊乱病(temporomandibular disorders, TMD)的确切病因及发病机制尚不完全清楚,临床上的治疗效果亦并不令人满意。探索其病因、发病机制及临床治疗手段仍将是未来相当长时间内的课题。本学位论文的研究工作旨在进一步揭示颞下颌关节紊乱病的病因及发病机制,并在促进关节软骨缺损的修复方面进行了新的尝试。

### 一、颞下颌关节紊乱病关节液中转化生长因子- $\beta 1$ 的检测

**目的** 研究转化生长因子- $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$ , TGF- $\beta 1$ )在颞下颌关节紊乱病病因及发病机制中的作用。

**方法** 采用夹心法酶联免疫吸附测定法(sandwich enzyme-linked immunosorbent assay, Sandwich-ELISA)对31例TMD患者及7例健康志愿者的关节液进行了TGF- $\beta 1$ 的检测。

**结果** 7例健康志愿者的关节液中未能检测到TGF- $\beta 1$ 的存在。结构紊乱类14例中只有4例呈阳性结果[(47.93  $\pm$  88.25) pg/mL,  $n = 14$ ],而骨关节病类17例中有16例能够检测到TGF- $\beta 1$ 的存在[(143.61  $\pm$  108.00) pg/mL,  $n = 17$ ],二者的差异具有显著性( $P < 0.01$ )。健康志愿者的关节液中TGF- $\beta 1$ 水平与颞下颌关节紊乱病患者关节液中TGF- $\beta 1$ 水平亦呈显著性差异( $P < 0.01$ )。

**结论** TGF- $\beta 1$ 在颞下颌关节紊乱病尤其是骨关节病类的病因及发病机制中可能起着重要作用。

## 二、颞下颌关节紊乱病关节液中白细胞介素-1受体拮抗剂和白细胞介素-10的检测

**目的** 探讨白细胞介素-1受体拮抗剂(interleukin-1 receptor antagonist, IL-1ra)和白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)在颞下颌关节紊乱病病因及发病机制中的作用。

**方法** Sandwich-ELISA对31侧TMD患者及7侧健康志愿者的关节液进行了IL-1ra和IL-10的检测。

**结果** 健康志愿者的关节液中不能检测到IL-1ra的存在, TMD患者的关节液中IL-1ra的平均水平为 $(182.40 \pm 55.83)$  pg/mL。TMD患者关节液的IL-1ra水平与健康志愿者关节液中IL-1ra水平之间的差异具有显著性( $P < 0.01$ )。颞下颌关节结构紊乱患者的IL-1ra水平为 $(175.78 \pm 52.43)$  pg/mL( $n = 14$ ), 颞下颌关节骨关节炎(OA)患者的IL-1ra水平为 $(187.85 \pm 59.51)$  pg/mL( $n = 17$ );两者的差异不具有显著性。健康志愿者和TMD患者的关节液中均不能检测到IL-10的存在。

**结论** IL-1ra和IL-10的缺乏或缺失在颞下颌关节紊乱病的病因及发病机制中可能起着重要作用。

## 三、重组人TGF- $\beta$ 1促进颞下颌关节髁状突软骨全层缺损修复的实验研究

**目的** 研究重组人转化生长因子- $\beta$ 1(rhTGF- $\beta$ 1)对颞下颌关节髁状突软骨缺损修复的影响。

**方法** 32只日本大耳白兔左侧髁状突施行了关节软骨的全层缺损手术。实验分为4组:实验组、牛血清白蛋白(bovine serum album, BSA)对照组、手术对照组及假手术对照组。实验组左侧颞下颌关节腔内注射rhTGF- $\beta$ 1, BSA对照组左侧颞下颌关节腔内注射含有0.4 mmol/L HCl的1 mg/mL的BSA,手术对照组及假手术对照组左侧颞下颌关节不作任何注射。实验动物分别于术后

第 4、8、12 和 16 周处死。采用常规组织学对髌状突缺损区的修复情况进行观察。

**结果** 在整个实验期间,绝大多数实验组动物(7/8)髌状突软骨缺损区的修复效果比 BSA 对照组和手术对照组修复效果明显为好。至术后 16 周时,实验组缺损区的组织学结构除纤维层较厚以外,其余各层次结构与正常对照侧的组织学结构基本相同。

**结论** TGF- $\beta$ 1 能够明显地促进颞下颌关节髌状突软骨缺损的修复;TGF- $\beta$ 1 有望成为治疗颞下颌关节骨关节病髌状突软骨缺损的有效药物之一。

#### 四、重组人血管内皮生长因子<sub>121</sub>真核表达质粒促进颞下颌关节软骨全层缺损修复的实验研究

**目的** 研究重组人血管内皮生长因子<sub>121</sub>真核表达质粒对颞下颌关节髌状突软骨全层缺损修复的影响。

**方法** 24 只日本大耳白兔左侧髌状突施行了关节软骨的全层缺损手术。实验分为 3 组:实验组、空白质粒对照组和手术对照组。实验组左侧颞下颌关节腔内注射重组人血管内皮生长因子<sub>121</sub>真核表达质粒 pcD2-VEGF<sub>121</sub>,空白质粒对照组左侧颞下颌关节腔内注射空白质粒 pcD2,手术对照组左侧颞下颌关节不作任何注射。实验动物分别于注射质粒后第 2、4、8 和 12 周处死。采用常规组织学对髌状突缺损区的修复情况进行观察。

**结果** 在整个实验期间,所有实验组动物髌状突软骨缺损区的修复效果比空白质粒对照组和手术对照组修复效果明显为好。至注射后 12 周时,实验组的缺损区虽然总体厚度较正常稍薄,但各层次结构均正常且等比例存在;而空白质粒对照组和手术对照组的缺损区透明软骨层软骨细胞的排列走行和正常的透明软骨层明显不一样,一侧与非手术区的增殖细胞层斜向移行,两侧与非手术区的界限均较明显。

**结论** pcD2-VEGF<sub>121</sub>真核细胞表达质粒能够有效地促进颞

下颌关节髌状突软骨缺损的修复。这表明,颞下颌关节腔内注射 pcD2 - VEGF<sub>121</sub> 真核表达质粒的基因治疗有望成为治疗颞下颌关节骨关节病髌状突软骨缺损的有效方法之一。

### 五、重组人突变型 TGF - $\beta$ 1 真核细胞表达质粒对颞下颌关节髌状突软骨全层缺损修复的影响

**目的** 研究重组人突变型 TGF -  $\beta$ 1 真核细胞表达质粒对颞下颌关节髌状突软骨全层缺损修复的影响。

**方法** 42 只新西兰白兔左侧髌状突施行了关节软骨的全层缺损手术。实验分为 2 组:实验组、空白质粒对照组。实验组左侧颞下颌关节腔内注射重组人突变型 TGF -  $\beta$ 1 真核细胞表达质粒 pcDI - mTGF -  $\beta$ 1, 空白质粒对照组左侧颞下颌关节腔内注射空白质粒 pcDI。实验于注射质粒后第 1、3、7、12、28、56 和 84 天计 7 批分别处死动物。采用反向转录 - 多聚酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT - PCR) 检测滑膜细胞中 mTGF -  $\beta$ 1 mRNA 的表达,并对髌状突缺损区的修复情况进行常规组织学观察。

**结果** 注射 pcDI - mTGF -  $\beta$ 1 后,经过 RT - PCR 检测表明,滑膜中 mTGF -  $\beta$ 1 的 mRNA 至少能够持续表达 7 天。组织学检查显示,实验期内,绝大多数实验组动物(16/21)髌状突软骨缺损区的修复效果比空白质粒对照组修复效果明显为好。至注射后 12 周时,实验组的缺损区组织学结构除纤维层较厚、透明软骨层较薄以外,其余各层次结构与正常对照侧的组织学结构基本相同;而空白质粒对照组缺损区凹陷明显,只剩下一层排列紊乱的纤维组织覆盖于软骨下骨层表面,无增殖细胞层。

**结论** 真核表达质粒 pcDI - mTGF -  $\beta$ 1 也能够明显地促进颞下颌关节髌状突软骨全层缺损的修复。这表明,基因治疗作为一种新的治疗手段有望应用于治疗骨关节病的临床实践中。

## 六、附录 重组人突变型 TGF- $\beta$ 1 真核细胞表达质粒的构建及表达

**目的** 构建成具有分泌大量活性形式的 TGF- $\beta$ 1 的重组人突变型 TGF- $\beta$ 1 真核细胞表达质粒。

**方法** 首先建立 U<sub>937</sub> cDNA 文库,从文库中扩增出天然形式的 TGF- $\beta$ 1 (nTGF- $\beta$ 1),利用 PCR 的方法对 nTGF- $\beta$ 1 进行定点突变,经序列测定之后,构建了真核表达质粒 pcDI-mTGF- $\beta$ 1,经过限制性内切酶酶切图谱分析筛选出目的质粒。然后,将 pcDI-mTGF- $\beta$ 1 进行瞬时表达和活性测定。

**结果** MTT 及 FACS 证明转染 pcDI-mTGF- $\beta$ 1 后的 Cos-7 细胞系上清明显地抑制 NFS-60 细胞系的生长或促进 NFS-60 细胞系的凋亡。

**结论** 本研究成功地构建了真核表达质粒 pcDI-mTGF- $\beta$ 1。它的构建成功为进一步研究 TGF- $\beta$ 1 的生物学功能及利用其进行基因治疗奠定了一定的基础。



## ABSTRACT

The exact aetiology and pathogenesis of temporomandibular disorders (TMD) remain unknown and the therapeutic results are still unsatisfying. Therefore, it still will be important issues to try to resolve these problems in the future. Several investigations in this dissertation are aimed at, to a certain degree, disclosing the aetiology and pathogenesis of TMD, and tried to develop a new method in the promotion of the repair of articular cartilage defect.

### **1. Detection of transforming growth factor - $\beta$ 1 in the Synovial Fluids of Patients with Temporomandibular Disorders**

***Purpose:*** This study was undertaken to examine the presence of transforming growth factor -  $\beta$ 1 (TGF -  $\beta$ 1) in the synovial fluids of patients with temporomandibular disorders.

***Patients and Methods:*** Synovial fluids were obtained from 14 temporomandibular joints of 12 patients with temporomandibular joint internal derangement (TMJ ID) and 17 temporomandibular joints of 15 patients with temporomandibular joint osteoarthritis (TMJ OA). 7 synovial fluid samples of temporomandibular joints of 4 asymptomatic donors served as normal controls. The concentrations of TGF -  $\beta$ 1 were detected with sensitive and specific sandwich enzyme - linked immunosorbent assay (Sandwich - ELISA).

***Results:*** TGF -  $\beta$ 1 could not be detected in 7 normal controls, whereas the mean TGF -  $\beta$ 1 concentrations in synovial fluids of patients with TMJ ID and OA were  $(100.40 \pm 109.26)$  pg/mL. The level of TGF -  $\beta$ 1 in TMD synovial fluids was significantly different from