

Smad7在兔下颌骨牵张成骨过程中的表达*

莘晓陶¹, 李曦光², 毕贤峰³, 张志纯³

Expression of Smad7 during mandibular alveolar distraction osteogenesis in rabbits

Xin Xiao-tao¹, Li Xi-guang², Bi Xian-feng³, Zhang Zhi-chun³

Abstract

BACKGROUND: Some studies have shown that Smad7 can combine and inhibit downstream signals of bone morphogenetic protein receptor, and bone morphogenetic protein can promote the distraction osteogenesis in the process of bone healing, in addition, Smad7 plays an inhibitory effect on cartilage formation. However, the mechanisms of Smad7 in the process of distraction osteogenesis have not been reported.

OBJECTIVE: To heighten the alveolar ridge of mandible using implant-distraction apparatus, and to investigate the law of Smad7 in distraction osteogenesis.

METHODS: A total of 24 male Japanese white rabbits were randomly divided into blank control group ($n = 4$) and distraction group ($n = 20$). In addition, the distraction group was divided into 1 day, 1, 2, 4, and 6 weeks subgroups, with 4 animals in each group. Distraction osteogenesis was performed on the left mandible of rabbits in the distraction groups with 4 days intervals, and the implant-distraction apparatus was used to increase in rabbit mandibular vertical alveolar ridge. The bone mineral density of mandible was measured at 1 day, 1, 2, 4 and 6 weeks after operation. The expression and distribution of Smad7 were observed by immunohistochemistry.

RESULTS AND CONCLUSION: A sprinkle of Smad7 was expressed in normal mandible tissues. The expression of Smad7 was greater at 1 day after distraction than that of the control group ($P < 0.05$). The expression of Smad7 was gradually decreased at 1, 2 and 4 weeks after distraction, but remained greater than that of the control group. The difference between the 6 weeks group and the control group had no significance ($P > 0.05$). The bone mineral density of mandible reached a trough at 1 day after distraction, gradually increased in the 1, 2 and 4 weeks after distraction, which greater than that of the control group ($P < 0.01$). It is suggesting that the varied expression of Smad7 may promote the new bone formation at early stage of distraction osteogenesis.

Xin XT, Li XG, Bi XF, Zhang ZC. Expression of Smad7 during mandibular alveolar distraction osteogenesis in rabbits. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(20): 3633-3636. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 有研究表明 Smad7 可结合并抑制骨形成蛋白受体的下游信号, 而骨形成蛋白可促进牵张成骨过程中的骨愈合, 并且 Smad7 对软骨形成起到抑制作用, 但 Smad7 在牵张成骨中的作用机制尚不清楚。

目的: 利用种植型牵张器增高兔下颌牙槽嵴, 观察下颌骨牵张成骨过程中 Smad7 的表达规律。

方法: 将雄性日本大耳白兔 24 只随机分为对照组 4 只, 牵张成骨组 20 只, 其中牵张成骨组再按牵张时间点不同再随机分为牵张成骨 1 d, 1, 2, 4 和 6 周组, 4 只/组。选取牵张成骨组兔左侧下颌骨行牵张成骨, 其间歇 4 d, 开始种植型牵张器垂直增高兔下颌牙槽嵴。各组分别于牵张成骨后 1 d, 1, 2, 4, 6 周取材, 在牵张成骨侧下颌骨行骨密度测量, 用免疫组织化学法观察兔下颌骨牵张过程中不同时期 Smad7 的表达和分布。

结果与结论: Smad7 在正常下颌骨组织中有少量表达, 在牵张后 1 d 下颌骨中的 Smad7 表达高于对照组 ($P < 0.05$)。牵张成骨后 1, 2 和 4 周组的 Smad7 表达比牵张成骨后 1 d 组有所减少, 但仍高于对照组, 牵张成骨后 6 周时与对照组差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。牵张区下颌骨骨密度值在牵张成骨后 1 d 最低, 1, 2 和 4 周组骨密度值相比对照组逐渐增高 ($P < 0.01$)。提示 Smad7 在牵张成骨过程的不同时期表达不同, Smad7 可能对牵张成骨早期的新骨形成起一定的促进调节作用。

关键词: 牵张成骨; Smad7; 下颌骨; 骨密度; 免疫组织化学; 骨组织构建

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.20.006

莘晓陶, 李曦光, 毕贤峰, 张志纯. Smad7 在兔下颌骨牵张成骨过程中的表达[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(20):3633-3636. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

牵张成骨是指在截开骨段处或骨缝处用牵引装置按一定的速度和频率牵开而产生的骨间隙中形成新骨。牵张成骨技术由于具备无需植骨, 手术操作简单, 创伤和风险小, 成骨期抗感染能力强, 成骨质量好, 软、硬组织同期修复等优点, 已逐渐成为研究和应用的热点^[1]。

牵张成骨的骨形成主要为骨组织受到缓

慢机械应力作用后, 激发了骨生长因子等一系列生物活性物质的合成和分泌, 促使牵张区域未分化间充质细胞向成骨方向增殖和转化, 并刺激骨基质合成, 最终形成一定体积的新骨组织^[2]。

有研究表明 Smad7 可结合并抑制骨形成蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP) 受体的下游信号, 而 BMP 可促进牵张成骨过程中的骨愈合^[3], 并且 Smad7 对软骨形成起到抑制作用^[4-5], 但 Smad7 在牵张成骨中的作用作者尚未

¹Department of Stomatology, First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China;
²Department of Oral Maxillofacial Surgery,
³Department of Comprehensive Stomatology, Second Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China

Xin Xiao-tao★, Master, physician, Department of Stomatology, First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China
tao19801128@sina.com

Correspondence to: Li Xi-guang, Chief physician, Department of Oral Maxillofacial Surgery, Second Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China
tao.apple@163.com

Received: 2009-12-24
Accepted: 2010-04-01

¹ 辽宁医学院附属第一医院口腔科, 辽宁省锦州市 121001; 辽宁医学院附属第二医院, ² 口腔颌面外科, ³ 口腔综合科, 辽宁省锦州市 121001

莘晓陶★, 女, 1980年生, 汉族, 辽宁省锦州市人, 2007年辽宁医学院毕业, 硕士, 医师, 主要从事牵张成骨机制的研究。tao19801128@sina.com

通讯作者: 李曦光, 主任医师, 辽宁医学院附属第二医院口腔颌面外科, 辽宁省锦州市 121001 taapple@163.com

中图分类号: R318
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225 (2010)20-03633-04

收稿日期: 2009-12-24
修回日期: 2010-04-01 (20091224012/WJ-Z)

查及相关报道。

实验运用免疫组织化学方法测定Smad7在牵张成骨模型中的表达及变化规律, 进一步揭示牵张成骨的分子生物学机制, 同时为临床治疗中加快牵张成骨的新骨形成速度提供一定的理论基础和实验资料。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 实验于2009-05/2010-03在辽宁医学院动物实验中心完成。

材料:

实验动物: 健康日本大耳白兔24只, 雌雄不限, 体质量(2.00±0.25) kg, 由辽宁医学院实验动物中心提供(动物许可证号: SCXK(辽)2009-0004)。实验过程中对动物的处理方法符合中华人民共和国科学技术部颁发的《关于善待实验动物的指导性意见》^[6]。

自制圆柱型种植型牵张器牵张器^[7-8]: 材质为TA2纯钛, 分别3种结构: 光滑导针, 位于内螺杆的顶端以增加骨升段的稳定性。内部结构, 以升高骨段。外部结构, 以骨基段紧密固位。

试剂和仪器:

试剂及仪器	来源
全自动万能显微镜	日本 Olympus 公司
细胞图像分析仪	中国大恒有限公司北京 图像视觉技术分公司
兔抗羊 Smad7 单克隆抗体, 生物素化山羊抗兔 IgG, SABC 试剂盒	武汉博士德生物有限 公司提供

方法:

分组和建模: 实验兔24只适应性圈养1周后, 随机分为对照组4只, 牵张成骨组20只, 其中牵张成骨组按牵张时间点不同再随机分为牵张成骨1 d, 1, 2, 4和6周组, 4只/组。

实验兔先用水合氯醛溶液麻醉, 分别进行耳缘静脉和腹腔注射, 于颞孔前缘向前与下颌骨上缘平行水平截骨, 两端向牙槽嵴方向垂直截骨, 形成 8 mm×5 mm骨升段。根据骨升段所在的位置安放种植牵张器, 逐级备洞, 调整窝洞的方向以确保种植牵张器的正确就位。种植牵张器就位后全层缝合骨膜、肌肉和皮肤, 种植体内部螺杆约有 5 mm暴露于口外以便牵张加力。经过4 d间歇期开始牵张, 2次/d, 每次升高0.5 mm, 即旋转牵张器内部结构2圈,

总共牵张4 d。

分别在以上牵张成骨处理后1 d, 1, 2, 4和6周处死动物, 取牵张成骨侧下颌骨进行观察^[9]。对照组不予手术直接处死取材。

骨密度测量: 20 °C条件下, 利用电子天平称牵张区骨组织质量 $m_{骨}$, 取1个20 mL量筒, 利用20 μL的滴液器向量筒内加注蒸馏水使其体积达到5 mL, 记录此时蒸馏水体积 V_1 和此时量筒及蒸馏水质量 m_1 , 然后将称质量后的骨组织置入该量筒内, 用20 μL的滴液枪继续加注蒸馏水至达到最小可计量刻度体积, 记录此时体积 V_2 和此时量筒及其内容物质量 m_2 。

追加蒸馏水的质量 $m_3 = m_2 - m_1 - m_{骨}$ 。
追加蒸馏水的体积 $V_3 = m_3 / 20\text{ °C时蒸馏水的密度}(20\text{ °C时, 蒸馏水密度为}0.99\text{ g/cm}^3)$ 。
骨组织的体积 $V_{骨} = V_2 - V_1 - V_3$ 。
骨组织的密度 $= m_{骨} / V_{骨}$, 求得牵张区组织骨密度(面积)^[10]

免疫组织化学检测: 下颌牵张区免疫组化染色采用ABC法^[11]。

切片常规脱蜡至水后, 用体积分数3% H₂O₂室温15 min以灭活内源性酶, 双蒸水冲洗3次; 将切片浸入0.01 mol/L枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0), 微波炉加热至沸腾后断电, 间隔5 min, 再次加热5 min, 室温冷却后PBS冲洗3次(或滴加胰蛋白酶消化液10~15 min, PBS冲洗3次); 湿盒内滴加体积分数5%BSA封闭液, 室温20 min后甩去多余液体; 滴加的兔抗羊Smad7单克隆抗体(1:75), 4 °C过夜, PBS冲洗3次; 滴加生物素化山羊抗兔IgG(1:100), 37 °C下孵育30 min, PBS冲洗3次; 滴加SABC, 37 °C下孵育30 min, PBS冲洗4次(以上PBS浓度均为0.01 mol/L); DAB显色, 室温控制反应, 蒸馏水充分洗涤; 苏木精轻度复染, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封固, 光学显微镜下观察。

以PBS代替一抗作为阴性对照, 以棕色颗粒代表Smad7的阳性表达, 需定量分析的切片均不复染。

设计, 实施, 评估者: 设计为第一作者, 实施为第一和第二作者, 评估为第三作者。参加人员均受过专业训练。

主要观察指标: Smad7在下颌骨牵张后新骨组织中的表达与分布。

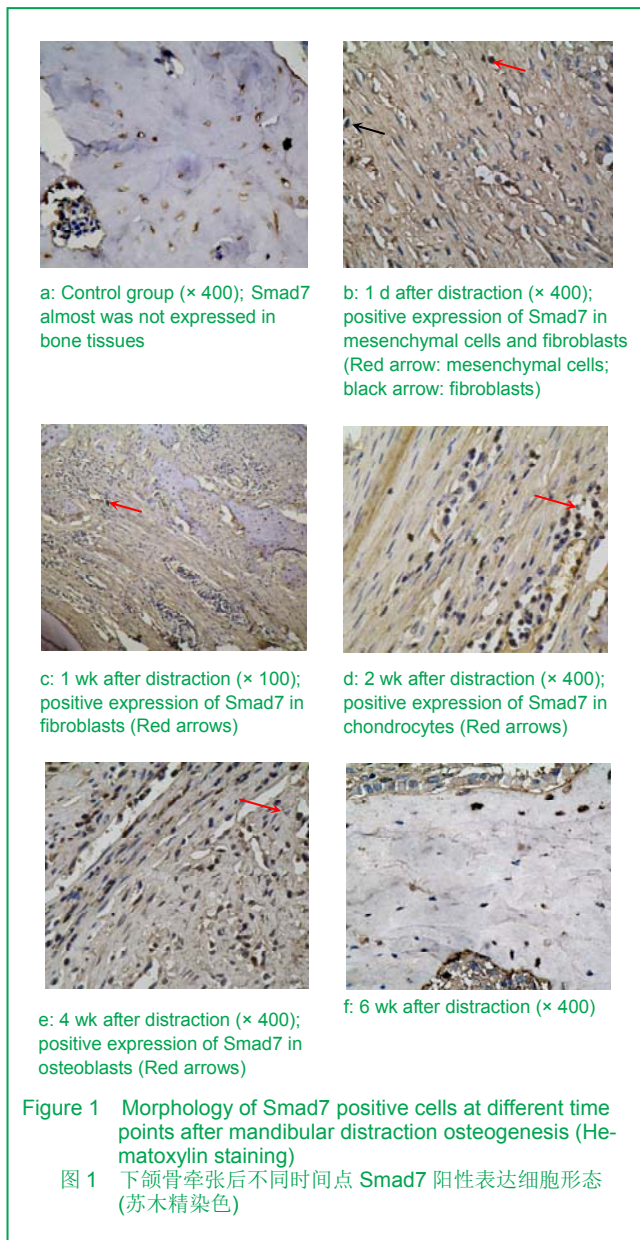
统计学分析: 实验计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 利用SPSS 14.0统计学软件进行数据分析, 组间差异比较采用单因素方差分析, 组内差异两

两比较采用SNK-*q*检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

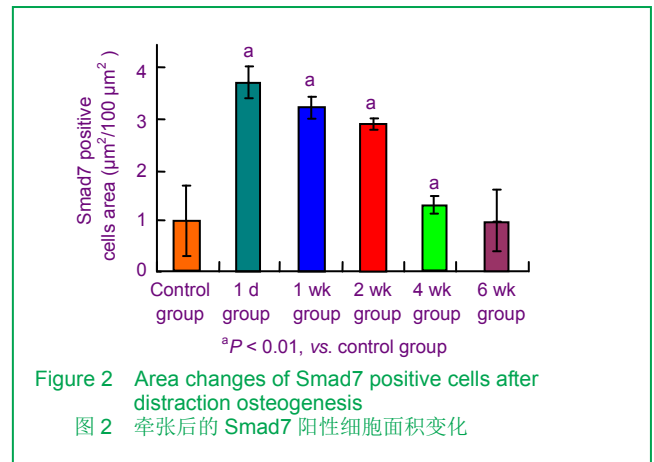
2 结果

2.1 实验动物数量分析 日本大耳白兔24只, 全部进入结果分析, 无脱落。

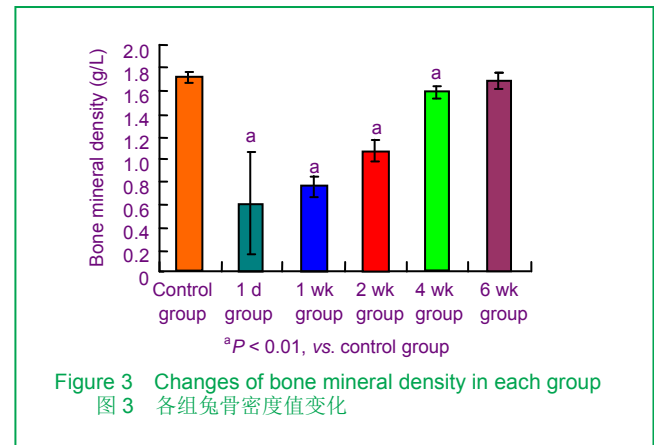
2.2 免疫组化结果观察 Smad7主要在牵张区成纤维细胞、成骨细胞、间充质细胞及少量软骨细胞中有表达, 主要在细胞胞浆染色, 也有少量胞核染色, 见图1。



Smad7在对照组中仅有少量阳性表达, 而Smad7在牵张后1 d阳性细胞面积达到峰值($P < 0.01$), 之后阳性表达逐渐减少, 到牵张后6周时已呈弱阳性, 与对照组比较差异无显著性意义($P > 0.05$), 见图1, 2。



2.3 骨密度值变化 牵张区下颌骨骨密度值在牵张后1 d最低, 1, 2和4周组骨密度值相比对照组逐渐增高($P < 0.01$), 牵张术后6周与对照组骨密度比差异无显著性意义($P > 0.05$), 见图3。



3 讨论

Smad7属于Smad蛋白中的抑制型Smad, Smad7蛋白是转化生长因子 $\beta 1$ 细胞内信号转导的负调控蛋白, 能反馈调节转化生长因子 $\beta 1$ 对靶基因的转录^[12-13]。Smad7牢固地与活化的转化生长因子 $\beta 1$ 型受体相互作用, 通过竞争受体而阻止受体限制性Smads的活化, Smad7可看作是转化生长因子 β 家族的通用抑制剂^[14]。实验免疫组化检测结果显示, 在牵张成骨过程中, 牵张区的骨痂中有Smad7的明显表达, 而正常骨组织内Smad7的表达较少, 结果提示Smad7可在牵张区合成和释放并对骨愈合起一定调节作用。

Cheung等^[15]研究表明, Smad7与BMP和软骨细胞功能关系密切, 在骨改建过程中具有重要的调节功能。Smad7还可结合并抑制BMP受体的下游信号^[16]。在非洲蟾蜍胚胎, 异位表达的鼠Smad7能拮抗BMP活化素样信号^[17]。据Bhushan等^[18]报道, Smad7还能抑制动物组织块活化素及BMP信号, Smad7还能阻断由活化素受体

ALK-4介导的信号及BMP-4信号。以上研究表明Smad7抑制由活化素A活化的hBMP-2并诱发其生长抑制及凋亡。Abdollah等^[19]的离体研究表明: Smad7抑制由转化生长因子 β 或BMP诱导的软骨细胞分化和(或)增殖, Smad7是转化生长因子 β 家族信号的抑制剂, 能有效抑制BMP受体的下游信号。

Zheng等^[20]在建立兔下颌骨牵张模型时, 局部注射BMP-2, 发现在固化2周与4周时注射BMP-2侧的骨量明显大于对照侧, 但在固化8周时与对照侧相比无明显区别, 说明BMP-2能促进牵张成骨, 但对最终的骨的质量无明显影响。Hamdy等^[21]用兔肢体延长模型研究发现在牵张成骨局部施加BMP-7, 能够通过多种渠道促进骨形成。Hu等^[22]应用小鼠下颌骨牵张模型, 向牵张部位注入转染了BMP-7的自体骨髓细胞后发现转染了BMP-7自体骨髓细胞明显促进牵张局部成骨。以上研究发现BMP-2, BMP-4和BMP-7均可以促进牵张成骨的骨形成, Smad7可能是转化生长因子 β 家族的通用抑制剂, 而且Smad7还可结合并抑制BMP受体的下游信号。实验由此推断Smad7有可能通过抑制BMP受体的下游信号而抑制牵张成骨的骨形成。Smad蛋白作为转化生长因子 β 信息传达因子以辅激活物的形式参与调节已成为众多学者关注的热点^[23]。

Iwai等^[24]研究表明, 小鼠在软骨细胞分化的各个阶段均有Smad7的过表达, 前软骨生成细胞中Smad7的过表达干扰了间质细胞的凝集, 导致软骨形成困难; 圆形软骨细胞中Smad7过表达抑制细胞增殖; 而扁平软骨细胞中Smad7的过表达则延迟细胞肥大。间质细胞的微量培养揭示Smad7可能通过下调BMP激活的p38 MAPK通路抑制软骨小结的形成。Smad7的受控表达对于正常的软骨发育和稳态至关重要, 以维持转化生长因子 β /BMP信号的同化作用。

实验发现Smad7在牵张后1 d组Smad7阳性面积表达达到最高值, 在牵张后1, 2, 4和6周组Smad7阳性面积表达逐渐减少, 6周组Smad7阳性面积表达与对照组差异无显著性意义。Smad7的表达在牵张成骨不同时期有不同的变化, 在牵张后1 d牵张早期骨及骨小梁相对很少并且骨组织破坏最严重时Smad7含量反而达到最高, 而随着骨及骨小梁的牵张成骨的骨愈合过程中Smad7含量逐渐减少, 在骨愈合最完善时Smad7含量反而最少, 说明对牵张成骨的新骨形成可能具有一定抑制作用, 这与上述研究的结论相吻合。Smad7可能抑制原发间充质细胞分化为成骨细胞前体或成骨细胞, 并抑制成骨细胞和成软骨细胞的增殖和分化。Smad7也有可能收缩血管, 阻止血管的发生与形成, 介导血流量降低, 破坏局部微循环, 抑制成骨细胞和成软骨细胞的增殖, 从而起到抑制骨形成的作用。但也有学者认为, Smad7在早期实际含量较基础水平减少, 随后浓度又不断回升

至正常水平, 这可能与动物模型、应激程度或检验方法等因素有关。

4 参考文献

- [1] Rubio-Bueno P, Naval L, Rodriguez Campo F, et al. Internal distraction osteogenesis with a unidirectional device for reconstruction of mandibular segmental defects. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005;63(5):598-608.
- [2] Liu Z, Luyten FP, Lammens J, et al. Molecular signaling in bonefracture healing and distraction osteogenesis. *Histol Histopathol.* 1999;14(2):587-595.
- [3] Marukawa K, Ueki K, Alam S, et al. Expression of bone morphogenetic protein-2 and proliferating cell nuclear antigen during distraction osteogenesis in the mandible in rabbits. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2006;44(2):141-145.
- [4] Baugé C, Legendre F, Leclercq S, et al. Interleukin-1beta impairment of transforming growth factor beta1 signaling by down-regulation of transforming growth factor beta receptor type II and up-regulation of Smad7 in human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 2007;56(9):3020-3032.
- [5] Wrana JL, Attisano L. The Smad pathway. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2000;11(1-2):5-13.
- [6] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. *Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals.* 2006-09-30.
- [7] Zhang ZC, Liu QM, Shuli Yiyaoxue Zazhi. 2007;20(3):316-318. 张志纯, 刘启明. 垂直牵张增高兔下颌牙槽嵴动物模型的建立[J]. *数理医药学杂志.* 2007;20(3):316-318.
- [8] Zhang ZC, Liu QM, Li XG. *Zhongguo Kouqiang Hemian Waiké Zazhi.* 2007;5(1):61-65. 张志纯, 刘启明, 李曦光. 一氧化氮合酶在兔下颌骨牵张成骨过程中的表达[J]. *中国口腔颌面外科杂志.* 2007;5(1):61-65.
- [9] Wei FC, Zhang D, Liu SH, et al. *Shanghai Kouqiang Yixue.* 2004;13(6):502-505. 魏奉才, 张东, 刘少华, 等. 兔双侧下颌骨牵张成骨实验动物模型的建立[J]. *上海口腔医学.* 2004, 13(6):502-505.
- [10] Zheng XH, Tian WD, Long J, et al. *Sichuan Daxue Xuebao.* 2005;36(3):386-389. 郑晓辉, 田卫东, 龙洁, 等. 山羊下颌骨牵张成骨术的实验研究[J]. *四川大学学报:医学版.* 2005, 36(3):386-389.
- [11] Zhang DH, Wang L, Qiao WL. *Xuzhou Yixueyuan Xuebao.* 2004;24(4):59-62. 张大红, 王琳, 乔伟丽. PowerVision法与SABC法在免疫组织化学染色中的比较[J]. *徐州医学院学报.* 2004, 24(4): 59-62.
- [12] Massagué J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors. *Genes Dev.* 2005;19(23):2783-2810.
- [13] Moustakas A, Heldin CH. From mono- to oligo-Smads: the heart of the matter in TGF-beta signal transduction. *Genes Dev.* 2002;16(15):1867-1871.
- [14] Tahashiy Y, Matsuzaki K, Date M, et al. Differential regulation of TGF-beta signal in hepatic stellate cells between acute and chronic rat liver injury. *Hepatology.* 2002;35(1):49-61.
- [15] Cheung LK, Zheng LW. Effect of distraction rates on expression of bone morphogenetic proteins in rabbit mandibular distraction osteogenesis. *J Craniomaxillofac Surg.* 2006;34(5):263-269.
- [16] Tamaki K, Souchelnytskyi S, Itoh S, et al. Intracellular signaling of osteogenic protein-1 through Smad5 activation. *Cell Physiol.* 1998;177(2):355-63.
- [17] Nakao A, Afrakhte M, Morén A, et al. Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signaling. *Nature.* 1997;389(6651):631-635.
- [18] Bhushan A, Chen Y, Vale W. Smad7 inhibits mesoderm formation and promotes neural cell fate in *Xenopus* embryos. *Dev Biol.* 1998;200(2):260-268.
- [19] Abdollah S, Macias-Silva M, Tsukazaki T, et al. TbetaRI phosphorylation of Smad2 on Ser465 and Ser467 is required for Smad2-Smad4 complex formation and signaling. *J Biol Chem.* 1997;272(44):27678-27685.
- [20] Zheng LW, Cheung LK. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on mandibular distraction at different rates in a rabbit model. *Tissue Eng.* 2006;12(11):3181-3188.
- [21] Haque T, Mandu M H, Lauzier D, et al. Immunohistochemical localization of bone morphogenetic protein-signaling Smads during long-bone distraction osteogenesis. *J Histochem Cytochem.* 2006;54(4):407-415.
- [22] Hu J, Qi MC, Zou SJ, et al. Callus formation enhanced by BMP-7ex vivo gene therapy during distraction osteogenesis in rats. *J Orthop Res.* 2007;25(2):241-251.
- [23] Davis BN, Hilyard AC, Iagna G, et al. SAMD proteins control DROSHA-mediated micro RNA maturation. *Nature.* 2008;454(7200):56-61.
- [24] Iwai T, Murai J, Yoshikawa H, et al. Smad7 inhibits chondrocyte differentiation at multiple steps during endochondral bone formation and down-regulates p38 mapk pathways. *J Biol Chem.* 2008;283(40):27154-27164.