

[文章编号] 1671-587X(2024)06-1547-10

DOI:10.13481/j.1671-587X.20240608

白藜芦醇对颞下颌关节骨关节炎的治疗作用及其机制

孙高^{1,2}, 何静¹, 赵琪¹, 石剑虹¹, 廖智玲¹, 田原野¹, 吴国民¹

(1. 吉林大学口腔医院口腔颌面外科, 吉林 长春 130021; 2. 吉林大学口腔医院吉林省牙发育及颌骨重塑与再生重点实验室, 吉林 长春 130021)

[摘要] **目的:** 探讨白藜芦醇对颞下颌关节骨关节炎(TMJOA)的治疗作用, 并阐明相关作用机制。**方法:** 45只SD大鼠随机分为对照组、模型组和白藜芦醇组, 每组15只。模型组和白藜芦醇组大鼠关节腔内注射 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 碘乙酸钠(MIA) $50\ \mu\text{L}$, 构建TMJOA大鼠模型; 对照组大鼠注射等量生理盐水。造模3周后, 白藜芦醇组大鼠注射 $80\ \mu\text{L}$ 白藜芦醇溶液, 每周1次, 连续3周, 对照组和模型组大鼠注射等量生理盐水。微型计算机断层扫描技术(Micro-CT)系统检测各组大鼠髁突结构, 计算感兴趣区的骨体积分数(BV/TV)、骨小梁厚度(Tb.Th)、骨小梁间距(Tb.p)和骨小梁数(Tb.N)。HE染色和甲苯胺蓝染色观察各组大鼠颞下颌关节(TMJ)组织病理形态表现, 免疫组织化学法检测各组大鼠TMJ组织中性别决定区Y框蛋白(SOX)-9、基质金属蛋白酶(MMP)-13、沉默信息调节因子(Sirt)1、磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)、磷酸化蛋白激酶B(p-Akt)和磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(p-mTOR)蛋白表达水平, 实时荧光定量PCR(RT-qPCR)法检测各组大鼠TMJ组织中SOX-9、MMP-13、Sirt1、PI3K、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)和蛋白激酶B(Akt) mRNA表达水平。**结果:** 造模3周后, 大鼠髁突骨质破坏明显, 表面粗糙不平, 延续性中断, 表明TMJOA大鼠模型造模成功。Micro-CT系统检测, 对照组大鼠髁突表面光滑, 形态规则, 骨质连续完整; 模型组大鼠髁突破坏明显, 骨质连续性受到不同程度破坏, 表面粗糙可伴有不同程度骨质缺损; 白藜芦醇组大鼠髁突病变减轻, 髁突形态外观得到一定的改善。与对照组比较, 模型组大鼠BV/TV和Tb.Th均明显降低($P<0.05$), Tb.Sp明显增加($P<0.05$); 与模型组比较, 白藜芦醇组大鼠BV/TV和Tb.Th均明显升高($P<0.05$), Tb.Sp明显减少($P<0.05$)。HE染色观察, 对照组大鼠髁突层次清晰, 软骨细胞排列规则, 整齐有序; 模型组大鼠髁突表面粗糙不平, 缺损明显, 呈现典型的TMJOA表现; 白藜芦醇组大鼠髁突表面略微粗糙, 整体分层大致清晰, 细胞排列较为有序。甲苯胺蓝染色观察, 对照组大鼠髁突肥大层软骨细胞呈蓝紫色, 染色明显且均匀; 模型组大鼠髁突肥大层软骨细胞淡染, 部分区域甚至失染; 白藜芦醇组大鼠髁突肥大细胞层染色基本明显且较为均匀。免疫组织化学法检测, 与对照组比较, 模型组大鼠TMJ组织中MMP-13、PI3K、p-Akt和p-mTOR蛋白表达水平均明显升高($P<0.05$), SOX-9和Sirt1蛋白表达水平均明显降低($P<0.05$); 与模型组比较, 白藜芦醇组大鼠TMJ组织中SOX-9和Sirt1蛋白表达水平均明显升高($P<0.05$), MMP-13、PI3K、p-Akt和p-mTOR蛋白表达水平均明显降低($P<0.05$)。RT-qPCR法检测, 与对照组比较, 模型组大鼠TMJ组织中MMP-13、PI3K、Akt和mTOR mRNA表达水平均明显升高($P<0.05$), SOX-9和Sirt1 mRNA表达水平均明显降低($P<0.05$); 与模型组比较, 白藜芦醇组大鼠TMJ组织中SOX-9和Sirt1 mRNA表达水平均明显升高($P<0.05$), MMP-13、PI3K、Akt和mTOR mRNA表达水平均明显降低($P<0.05$)。**结论:** 白藜芦醇对TMJOA有治疗作用, 其作用机制可能是通过激活Sirt1、抑制PI3K-Akt-mTOR信号通路实现的。

[关键词] 白藜芦醇; 颞下颌关节骨关节炎; 沉默信息调节因子1; 磷脂酰肌醇3激酶; 蛋白激酶B; 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白

[中图分类号] R684.3 **[文献标志码]** A

[收稿日期] 2023-11-14

[基金项目] 吉林省科技厅科技发展计划项目(20230204088YY)

[作者简介] 孙高(1994—), 男, 浙江省宁波市人, 在读硕士研究生, 主要从事颞下颌关节疾病诊断及治疗等方面的研究。

[通信作者] 吴国民, 教授, 主任医师, 博士研究生导师(E-mail: guominwu2006@sina.com)

Therapeutic effect of resveratrol on osteoarthritis of temporomandibular joint and its mechanism

SUN Gao^{1,2}, HE Jing¹, ZHAO Qi¹, SHI Jianhong¹, LIAO Zhiling¹, TIAN Yuanye¹, WU Guomin¹

(1. Department of Oral and Maxillofacial Surgery I and Oral Plastic Surgery, Stomatology Hospital, Jilin University, Changchun 130021, China; 2. Jilin Provincial Key Laboratory of Tooth Development and Bone Remodeling and Regeneration, Stomatology Hospital, Jilin University, Changchun 130021, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the therapeutic effect of resveratrol on the temporomandibular joint osteoarthritis (TMJOA), and to clarify the related mechanism. **Methods:** Forty-five SD rats were randomly divided into control group, model group, and resveratrol group, and there were 15 rats in each group. The rats in model group and resveratrol group were intra-articularly injected with 50 μL of 20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ monosodium iodoacetate (MIA) to set TMJOA rat models, while the rats in control group were injected with an equal volume of normal saline. Three weeks after modeling, the rats in resveratrol group received an injection of 80 μL resveratrol solution, once a week for three weeks, while the rats in control and model groups were injected with an equal volume of normal saline. Micro-computed tomography (Micro-CT) system was used to detect the condyle structure and the bone volume fraction (BV/TV), trabecular thickness (Tb. Th), trabecular spacing (Tb. Sp), and trabecular number (Tb. N) of the rats in various groups were calculated; HE staining and toluidine blue staining were used to observe the pathomorphology of temporomandibular joint (TMJ) tissue of the rats in various groups; immunohistochemistry was used to detect the expression levels of SRY-related HMG box (SOX)-9, matrix metalloproteinase (MMP)-13, silent information regulator (Sirt)1, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), phosphorylated protein kinase B (p-Akt), and phosphorylated mammalian target of rapamycin (p-mTOR) in TMJ tissue of the rats in various groups; real-time quantitative PCR (RT-qPCR) method was used to detect the expression levels of SOX-9, MMP-13, Sirt1, PI3K, mTOR, and Akt mRNA in TMJ tissue of the rats in various groups. **Results:** Three weeks after modeling, condylar bone was destructed, the surface was roughness, and continuity interruption were observed, indicating TMJOA model of the rats was established successfully. The Micro-CT system results showed that the condylar surface of the rats in control group was smooth and regularly shaped, with continuous bone texture; the rats in model group had significant condylar destruction, disrupted continuity, surface roughness, and varying degrees of bone defects; the rats in resveratrol group showed alleviated condylar lesions and improved appearance. Compared with control group, the BV/TV and Tb. Th of the rats in model group were significantly decreased ($P<0.05$), and Tb. Sp was significantly increased ($P<0.05$); compared with model group, the BV/TV and Tb. Th of the rats in resveratrol group were significantly increased ($P<0.05$), and the Tb. Sp was significantly decreased ($P<0.05$). The HE staining results showed clear layers and orderly chondrocyte arrangement in condyle of the rats in control group; the rats in model group showed rough uneven surface, obvious defects, and typical TMJOA features; the rats in resveratrol group showed slightly rough surface with generally clear layers and orderly arranged cells. The toluidine blue staining results showed distinct blue-purple staining of chondrocytes in hypertrophic layer of the rats in control group; pale staining or even loss of staining in some areas of the rats in model group; and distinct and relatively uniform staining in hypertrophic layer of the rats in resveratrol group. The immunohistochemistry results showed that compared with control group, the expression levels of MMP-13, PI3K, p-Akt, and p-mTOR proteins in TMJ tissue of the rats in model group were significantly increased ($P<0.05$), while the expression levels of SOX-9 and Sirt1 proteins in TMJ tissue of the rats were significantly decreased ($P<0.05$); compared with model group,

the expression levels of SOX-9 and Sirt1 proteins in TMJ tissue of the rats in resveratrol group were significantly increased ($P < 0.05$), whereas the expression levels of MMP-13, PI3K, p-Akt, and p-mTOR proteins were significantly decreased ($P < 0.05$). The RT-qPCR results showed that compared with control group, the expression levels of MMP-13, PI3K, Akt, and mTOR mRNA in TMJ tissue of the rats in model group were significantly increased ($P < 0.05$), while the expression levels of SOX-9 and Sirt1 mRNA were significantly decreased ($P < 0.05$); compared with model group, the expression levels of SOX-9 and Sirt1 mRNA in TMJ tissue of the rats in resveratrol group were significantly increased ($P < 0.05$), whereas the expression levels of MMP-13, PI3K, Akt, and mTOR mRNA were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion:** Resveratrol has therapeutic effect on TMJOA, and its mechanism may be related to the activation of Sirt1 and inhibition of the PI3K-Akt-mTOR signaling pathway.

KEYWORDS Resveratrol; Temporomandibular joint osteoarthritis; Silence information regulation 1; Phosphoinositide 3-kinase; Protein kinase B; Mammalian target of rapamycin

颞下颌关节 (temporomandibular joint, TMJ) 由颞骨关节面、关节盘、髁突、关节韧带和关节囊组成, 作为颌面部唯一的联动关节, 在咀嚼、吞咽、表情、呼吸及言语等下颌功能运动中发挥作用^[1]。在 TMJ 相关疾病中, 以颞下颌关节紊乱病 (temporomandibular joint disorder, TMD) 最为常见^[2]。颞下颌关节骨关节炎 (temporomandibular joint osteoarthritis, TMJOA) 是 TMD 的重症表现, 常出现典型的关节疼痛、关节功能丧失、关节不稳定、错颌甚至面部畸形^[3], 女性患者较男性患者多见, 尤其是青春期后和生育期间的女性^[4]。对于 TMJOA, 目前仅限于保守治疗以控制症状或开放手术, 尚无有效的疾病修复办法以修复和再生受损的 TMJ^[5-7]。

白藜芦醇属天然抗氧化物质, 是来源于自然植物的多酚化合物, 在虎杖、花生和葡萄等植物中含量丰富, 由植物毛叶藜芦的根部第一次提取出来^[8]。白藜芦醇存在顺式和反式 2 种同分异构体, 自然界中以反式同分异构体为主, 其作用多样, 在抗真菌、抗炎、抗氧化、抗肿瘤和心脏及神经等组织器官中发挥重要的保护作用^[9]。研究^[10]发现: 白藜芦醇在骨科疾病如骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 中也具有重要作用, 可以通过抑制早期 OA 炎症相关因子的表达而达到治疗 OA 的效果。尽管关于白藜芦醇治疗 OA 的研究^[11-12]已经取得了一定的进展, 但是主要集中于膝关节, 关于白藜芦醇在 TMJOA 治疗中作用的研究较少。近年来, 有学者^[13]观察了白藜芦醇对 TMJOA 软骨破坏和滑膜炎的影响, 但目前报道极少, 且缺乏机制方面的进一步探索。

本研究通过关节腔内常规注射碘乙酸钠 (monosodium iodoacetate, MIA) 法构建大鼠

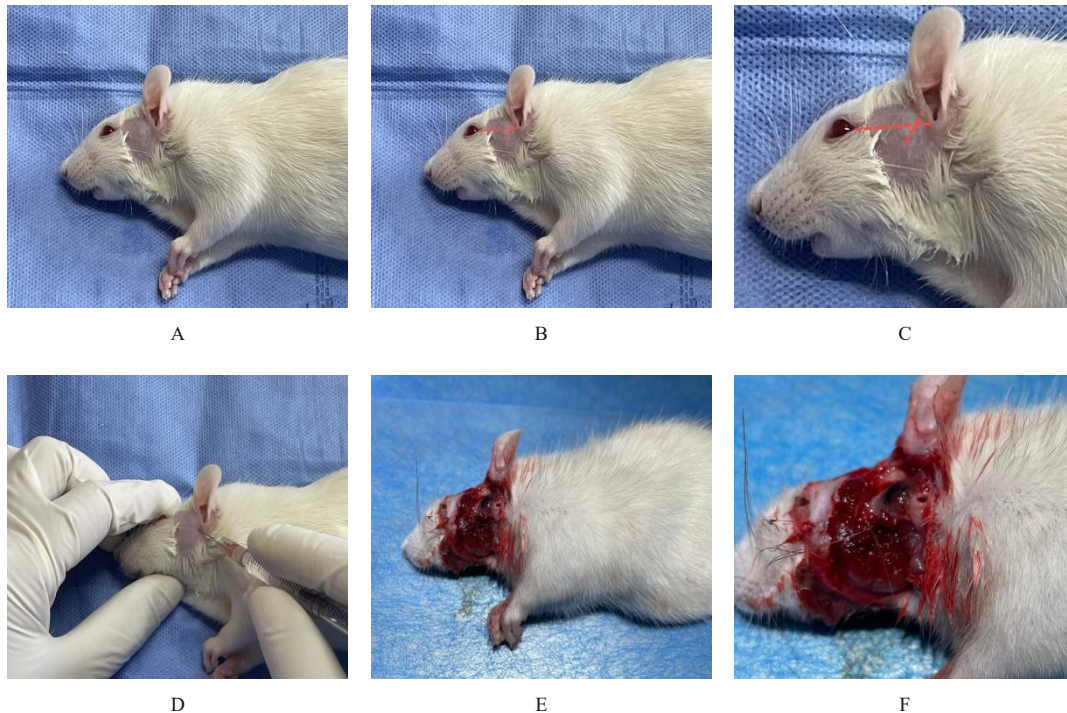
TMJOA 模型, 探讨白藜芦醇对 TMJOA 大鼠关节软骨的影响, 并阐明其具体的作用机制, 以期为 TMJOA 的临床诊疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物、主要试剂和仪器 6 周龄 SD 雄性大鼠 45 只, 实验动物使用许可证号: SYXK (吉) 2023-0010, 体质量 150~200 g, 购自长春亿斯实验动物技术有限责任公司。大鼠饲养于吉林大学基础医学院动物房中, 保持环境清洁, 恒温恒湿, 定期消毒和通风, 实验前所有大鼠适应性喂养 1 周。本实验经过吉林大学基础医学院动物伦理委员会批准 (伦理审批号: 2022450), 实验过程均符合实验室动物伦理准则。MIA 和二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 购自上海阿拉丁公司, 白藜芦醇购自上海麦克林公司, 乙二胺四乙酸 (ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA) (型号: 1340GR500) 购自德国 BioFroxx 公司, HE 染色试剂盒 (型号: C0105) 购自上海碧云天生物技术有限公司, 甲苯胺蓝染色液 (型号: G3661)、DAB 显色剂和 0.1% 亚甲基蓝染色液 (型号: G1300) 购自北京索莱宝生物科技有限公司, 兔源沉默信息调节因子 (silence information regulator, Sirt)1 一抗 (型号: ab189494) 购自美国 Abcam 公司, 兔源基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP)-13 (型号: bs-10250R)、磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K) (型号: bs-10657R)、蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) (型号: bs-6951R) 和哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) (型号: bs-1992R) 一抗购自均北京博奥森生物技术有限公司, 兔 SP 试剂盒购

自北京中杉金桥生物技术有限公司, TRIzol 试剂购自日本 TaKaRa 公司, 逆转录 PCR 试剂盒和实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR) 试剂盒购自上海翊圣生物科技有限公司, PCR 引物购自生工生物工程(上海)股份有限公司。微型计算机断层扫描技术 (micro-computed tomography, Micro-CT) 系统购自瑞士 Scanco Medical AG 公司, 分光光度计购自美国 Thermo Fisher 公司, PCR 仪购自瑞士 Roche 公司。

1.2 实验动物分组和模型制备 45 只大鼠随机分为对照组、模型组和白藜芦醇组, 每组 15 只。模型组和白藜芦醇组大鼠腹腔注射麻醉, 侧卧位, TMJ 周围区域消毒、备皮, 于眼外眦与外耳道下缘连线并距离外耳道下缘 3~4 mm 处和颧弓后下方, 向前内上进针, 抵达骨壁回抽无血后, 向两侧关节腔内注射 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MIA $50 \mu\text{L}$, 留针 1 min, 构建 TMJOA 大鼠模型, 对照组大鼠注射等量生理盐水。见图 1。



A: Position; B: Injection site; C: Localized enlargement of injection site; D: Injection angle; E: Accurate injection of methylene blue, blue impregnated area seen in joint cavity; F: Localized enlargement of joint cavity.

图1 TMJOA大鼠模型

Fig. 1 TMJOA rat models

1.3 各组大鼠处理方法和组织取材 造模 3 周后, 白藜芦醇组大鼠注射 $80 \mu\text{L}$ 白藜芦醇溶液 (0.5 mg 白藜芦醇溶于 $80 \mu\text{L}$ DMSO 中), 每周 1 次, 连续 3 周, 对照组和模型组大鼠注射等量生理盐水。注射完成 1 周后, 麻醉下颈椎脱臼处死大鼠, 完整取出双侧 TMJ 组织, 一侧放入 4% 多聚甲醛溶液中固定, 脱钙后用于 HE 和免疫组织化学染色, 一侧放入 -80°C 冰箱冻存, 用于后续实验。

1.4 Micro-CT 系统检测各组大鼠髁突结构 将样本置入高分辨率体内 X 射线 Micro-CT 系统中扫描, 扫描完成后进行三维重建, 并于髁突顶部软骨与软骨下骨交界处正下方, 选取横截面积 0.5 mm^2 , 长

轴 1.0 mm 的圆柱体作为感兴趣区, 检测感兴趣区的骨体积分数 (BV/TV)、骨小梁厚度 (Tb. Th)、骨小梁间距 (Tb. p) 和骨小梁数 (Tb. N), 其中 BV/TV、Tb. Th 和 Tb. N 与骨质量呈正相关关系, Tb. p 与骨质量呈负相关关系。

1.5 HE 染色和甲苯胺蓝染色观察各组大鼠 TMJ 组织病理形态表现 大鼠 TMJ 组织采用 4% 多聚甲醛固定后, 脱钙 3 个月, 期间可视情况更换脱钙液, 至 1 mL 注射器针尖可无阻力刺穿组织, 脱水、透明、浸蜡、包埋和切片, 采用 HE 染色和甲苯胺蓝染色, 光学显微镜下观察并进行图像处理。

1.6 免疫组织化学法检测各组大鼠 TMJ 组织中性别决定区 Y 框蛋白 (sex determining region Y box protein, SOX)-9、MMP-13、Sirt1、PI3K、磷酸化 Akt (phosphorylated-Akt, p-Akt) 和磷酸化 mTOR (phosphorylated-mTOR, p-mTOR) 蛋白表达水平

取各组大鼠 TMJ 组织, 进行脱蜡和水化, 胃蛋白酶抗原修复, 内源性过氧化物酶阻断, 滴加一抗, 4 °C 过夜, 加入反应增强液和增强酶标山羊抗兔 IgG, DAB 显色, 苏木精复染, 于显微镜下观察, 采用 Image J 软件检测, 计算各组大鼠 TMJ 组织免疫组织化学染色平均光密度值, 以平均光密度

值代表目的蛋白表达水平。平均光密度 = 区域内特定染色部分累积光密度 (IOD) / 区域面积。

1.7 RT-qPCR 法检测各组大鼠 TMJ 组织中 SOX-9、MMP-13、Sirt1、PI3K、mTOR 和 Akt mRNA 表达水平

大鼠髁突软骨研磨至粉末状, TRIzol 提取软骨组织 RNA, DEPC 水溶解, Nanodrop 测定 RNA 浓度, 逆转录为 cDNA, SYBR 法扩增, 95 °C、30 s 预变性, 95 °C、10 s, 60 °C、30 s, 95 °C、15 s, 60 °C、60 s, 95 °C、15 s, 共 40 个循环。以 GAPDH 内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因表达水平。引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

Tab. 1 Primer sequences of PCR

Gene	Forward sequence(5'-3')	Reverse sequence(5'-3')
SOX-9	CACTACAGCGAGCAGCAGCAG	TGATGGTTGGGTAGGAGGGGTTG
MMP-13	CAGCCCTATCCCTTGATGCCATTAC	GGGTGCAGACGCCAGAAGAATC
Sirt1	ACGCCTTATCCICTAGTTCCTGTGG	CGGTCTGTCAGCATCATCTTCCAAG
PI3K	GCCTCAGTGGACTTGGATGTGTTC	GTCTTCGGAGCTTGGTACTTCTTGG
Akt	CGCTTCTTTGCCAACATCGT	ACACTCCATGCTGTCATCTTGA
mTOR	CATTCCGACCGCTGCCTTAC	GACCTCACCGCCACAGAAAGC
GAPDH	AGTCTACTGECGTCTTACC	CCACGATGCCAAAGTTGTCA

1.8 统计学分析

采用 SPSS 22.0 统计软件进行统计学分析。各组大鼠骨结构参数, TMJ 组织中 SOX-9、MMP-13、Sirt1、PI3K、mTOR 和 Akt mRNA 表达水平及 SOX-9、MMP-13、Sirt1、PI3K、p-Akt 和 p-mTOR 蛋白表达水平均符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间样本均数两两比较采用 SNK-*q* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

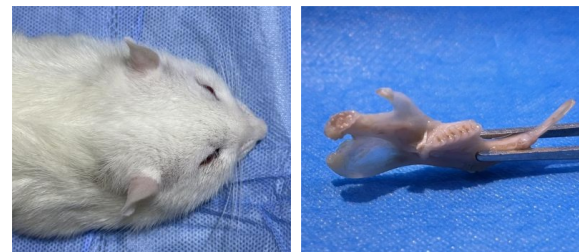
2 结果

2.1 TMJOA 大鼠模型

MIA 注射 1 d 后, 大鼠面部术区周围出现明显肿胀。造模 3 周后, 大鼠髁突骨质破坏明显, 表面粗糙不平, 延续性中断, 表明 TMJOA 大鼠模型制备成功。见图 2。

2.2 各组大鼠髁突结构

对照组大鼠髁突表面光滑, 形态规则, 骨质连续完整; 模型组大鼠髁突破坏明显, 骨质连续性受到不同程度破坏, 表面粗糙可伴有不同程度骨质缺损; 白藜芦醇组大鼠髁突病变减轻, 髁突形态外观得到一定的改善。见图 3。与对照组比较, 模型组大鼠 BV/TV 和 Tb. Th 均明显降低 ($P < 0.05$), Tb. Sp 明显增加 ($P < 0.05$);



A: Facial tissue; B: Condylar tissue.

图 2 TMJOA 模型大鼠面部和髁突组织

Fig. 2 Facial and condylar tissues of TMJOA model rats

Tb. N 减少, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与模型组比较, 白藜芦醇组大鼠 BV/TV 和 Tb. Th 均明显升高 ($P < 0.05$), Tb. Sp 明显减少 ($P < 0.05$); Tb. N 增加, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。

2.3 各组大鼠 TMJ 组织病理形态表现

HE 染色结果显示: 对照组大鼠髁突分为纤维层、增殖层、肥大层和透明软骨层, 层次清晰, 软骨细胞排列规则, 整齐有序。模型组大鼠髁突表面粗糙不平, 缺损明显, 软骨分层不明显, 细胞数量减少, 出

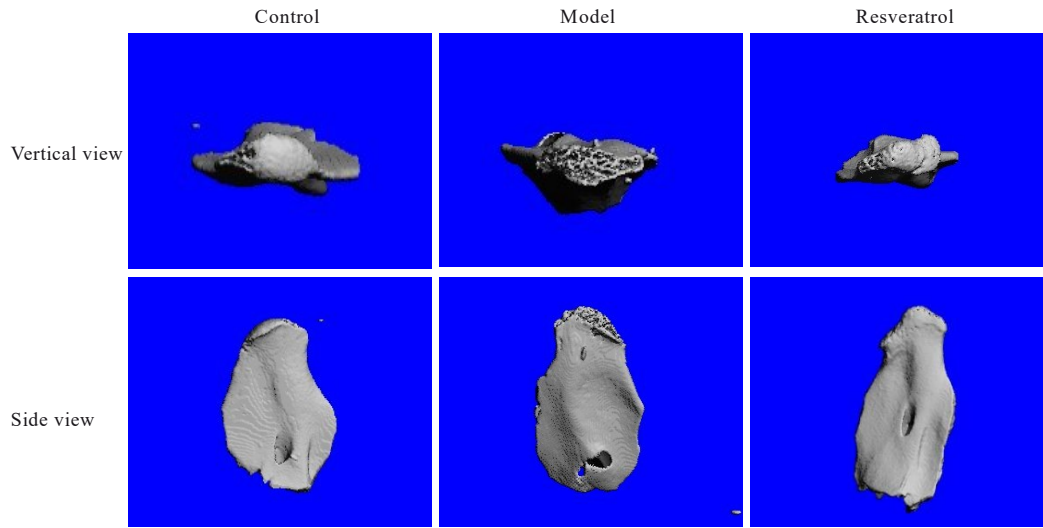


图3 各组大鼠髁突三维重建图

Fig. 3 Three-dimensional reconstruction diagrams of condyle of rats in various groups

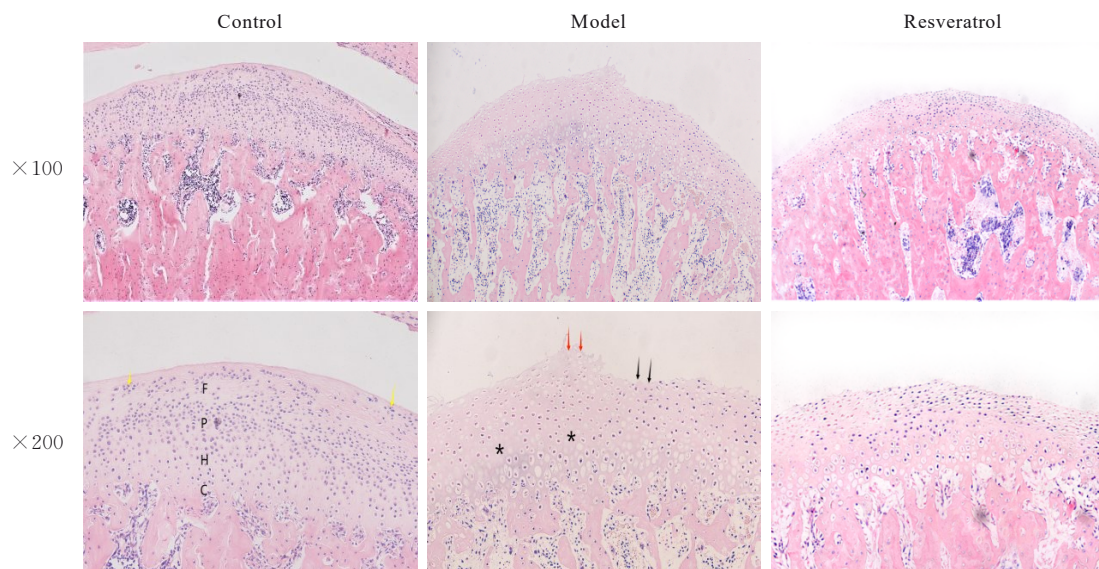
表2 各组大鼠髁突结构参数

Tab. 2 Structural parameters of condyle of rats in various groups (n=15, $\bar{x} \pm s$)

Group	BV/TV	Tb.Th (l/mm)	Tb.Sp (l/mm)	Tb.N (l/mm)
Control	0.68±0.05	0.14±0.02	0.10±0.02	7.02±1.67
Model	0.25±0.07*	0.07±0.01*	0.16±0.02*	6.00±0.59
Resveratrol	0.59±0.06 [△]	0.11±0.02 [△]	0.10±0.02 [△]	7.75±0.21

*P<0.05 vs control group; [△]P<0.05 vs model group.

现无细胞区及裂隙, 细胞排列紊乱, 界限不清, 呈现典型的TMJOA表现。白藜芦醇组大鼠髁突表面略微粗糙, 整体分层大致清晰, 细胞数量轻微减少, 细胞排列较为有序。见图4。甲苯胺蓝染色结果显示: 对照组大鼠髁突肥大层软骨细胞呈蓝紫色, 染色明显且均匀; 模型组大鼠髁突肥大层软骨细胞淡染, 部分区域甚至失染; 白藜芦醇组大鼠髁突肥大细胞层染色基本明显且较为均匀。见图5。



“F” indicated fibrous layer; “P” indicated value-added layer; “H” indicated hypertrophic layer; “C” indicated calcified cartilage layer; Black arrows indicated disintegration of fibrous tissue; Red arrows indicated rough and uneven surface; Yellow arrows indicated clusters of cells; Asterisks indicated cell-free zones.

图4 HE染色观察各组大鼠TMJ组织病理形态表现

Fig. 4 Pathomorphology of TMJ tissue of rats in various groups observed by HE staining

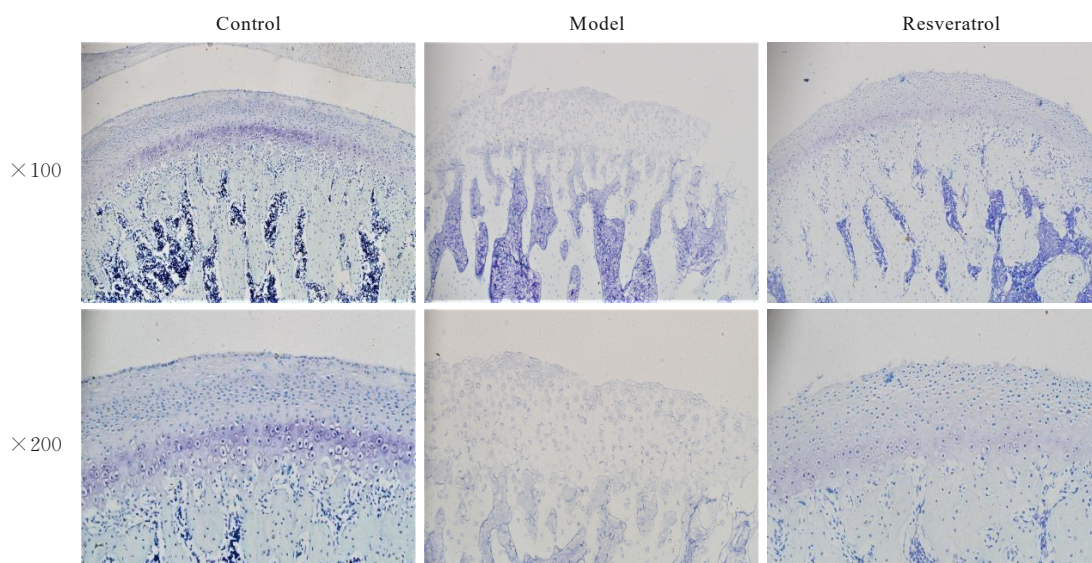


图5 甲苯胺蓝染色观察各组大鼠TMJ组织病理形态表现

Fig. 5 Pathomorphology of TMJ tissue of rats in various groups observed by toluidine blue staining

2.4 各组大鼠TMJ组织中SOX-9、MMP-13、Sirt1、PI3K、p-Akt和p-mTOR蛋白表达水平 与对照组比较, 模型组大鼠TMJ组织中MMP-13、PI3K、p-Akt和p-mTOR蛋白表达水平均明显升高 ($P < 0.05$), SOX-9和Sirt1蛋白表达水平均明显降低 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 白藜芦醇组大鼠TMJ组织中SOX-9和Sirt1蛋白表达水平均明显升高 ($P < 0.05$), MMP-13、PI3K、p-Akt和p-mTOR蛋白表达水平均明显降低 ($P < 0.05$)。见图6和表3。

2.5 各组大鼠TMJ组织中SOX-9、MMP-13、Sirt1、PI3K、mTOR和Akt mRNA表达水平 与对照组比较, 模型组大鼠TMJ组织中MMP-13、PI3K、Akt和mTOR mRNA表达水平均明显升高 ($P < 0.05$), SOX-9和Sirt1 mRNA表达水平均明显降低 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 白藜芦醇组大鼠TMJ组织中SOX-9和Sirt1 mRNA表达水平均明显升高 ($P < 0.05$), MMP-13、PI3K、Akt和mTOR mRNA表达水平均明显降低 ($P < 0.05$)。见表4。

3 讨论

TMJOA作为一种常见的疾病, 在人群中具有较高的患病率。TMJOA在20~49岁年龄组患者患病率为25%, 而73~75岁年龄组患者患病率高达70%^[14]。近年来, TMJOA的发展趋势逐渐年轻化, 青少年发病率也急剧上升, 严重影响青少年

TMJ的生长发育^[15]。

目前在多种治疗方式之中, 与物理疗法如电、光和超声等比较, 通过关节腔内注射药物的方式治疗TMJOA疗效确切, 应用广泛, 患者易于接受。白藜芦醇由于其抗炎和抗氧化等特性, 能够在OA中发挥作用, 达到减轻炎症和保护软骨。研究^[16-17]表明: 白藜芦醇能够减少膝关节软骨细胞中炎症因子的释放, 促进软骨组织修复和再生。与膝关节比较, TMJ具有其特殊性, 因此白藜芦醇在TMJOA中的作用尚需进一步明确。本研究结果显示: 与模型组比较, 白藜芦醇组髁突顶软骨下骨BV/TV和Tb.Th明显升高, Tb.Sp明显减少, 提示白藜芦醇能够有效减少骨吸收, 促进骨修复, 对TMJOA发展起抑制作用。此外, HE染色和免疫组织化学染色结果显示: 与模型组比较, 白藜芦醇组大鼠髁突表面光滑, 分层清晰, 排列有序, 且SOX-9蛋白表达水平明显升高, MMP-13蛋白表达水平明显降低, 从组织病理和蛋白分子角度证实白藜芦醇能减少组织分解, 促进软骨合成, 抑制炎症发展。本研究结果显示: 白藜芦醇组大鼠炎症相关基因表达水平明显降低, 软骨合成的相关基因表达水平明显升高。本研究从不同方面明确了白藜芦醇对TMJOA的治疗效果, 与相关研究^[18]结果一致。

Sirts是高度保守的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD⁺)依赖的组蛋白/蛋白去乙酰化酶中Sirt2家族成员, 为长寿

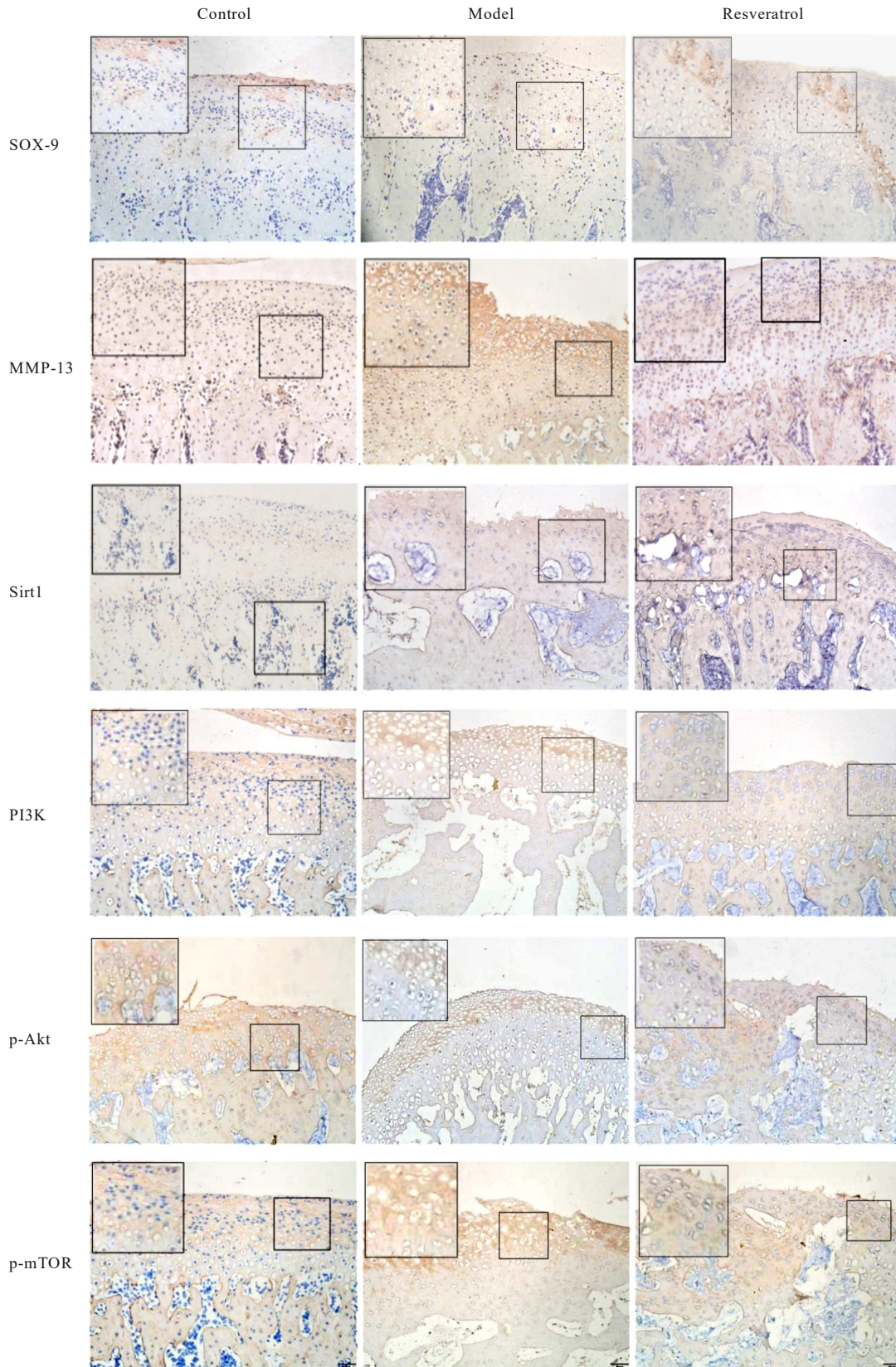


图6 各组大鼠TMJ组织中SOX-9、MMP-13、Sirt1、PI3K、p-Akt和p-mTOR蛋白表达情况(免疫组织化学, $\times 200$)
Fig. 6 Expressions of SOX-9, MMP-13, Sirt1, PI3K, p-Akt, and p-mTOR proteins in TMJ tissue of rats in various groups (Immunohistochemistry, $\times 200$)

表3 各组大鼠TMJ组织中SOX-9、MMP-13、Sirt1、PI3K、p-Akt和p-mTOR蛋白表达水平

Tab. 3 Expression levels of SOX-9, MMP-13, Sirt1, PI3K, p-Akt, and p-mTOR proteins in TMJ tissue of rats in various groups (n=15, $\bar{x} \pm s$)

Group	SOX-9	MMP-13	Sirt1	PI3K	p-Akt	p-mTOR
Control	0.23±0.02	0.18±0.01	0.32±0.01	0.20±0.02	0.17±0.03	0.16±0.01
Model	0.16±0.02*	0.29±0.01*	0.21±0.01*	0.28±0.01*	0.27±0.01*	0.25±0.02*
Resveratrol	0.20±0.01 [△]	0.22±0.01 [△]	0.27±0.01 [△]	0.22±0.01 [△]	0.18±0.03 [△]	0.16±0.02 [△]

*P<0.05 vs control group; [△]P<0.05 vs model group.

表4 各组大鼠TMJ组织中SOX-9、MMP-13、Sirt1、PI3K、mTOR和Akt mRNA表达水平

Tab. 4 Expression levels of SOX-9, MMP-13, Sirt1, PI3K, mTOR, and Akt mRNA in TMJ tissue of rats in various groups (n=15, $\bar{x} \pm s$)

Group	SOX-9	MMP-13	Sirt1	PI3K	Akt	mTOR
Control	1.00±0.04	1.00±0.05	1.01±0.18	1.01±0.19	1.01±0.20	1.00±0.12
Model	0.39±0.04*	1.72±0.08*	0.37±0.07*	2.65±0.35*	3.33±0.25*	2.57±0.39*
Resveratrol	0.57±0.07 [△]	1.54±0.06 [△]	0.91±0.08 [△]	1.63±0.15 [△]	1.48±0.25 [△]	1.26±0.34 [△]

*P<0.05 vs control group; [△]P<0.05 vs model group.

和健康的关键调节器^[19]。Sirt与多种细胞信号通路有关,包括抗炎、衰老、凋亡、DNA损伤修复、自噬和调节细胞能量及氧化还原状态下的代谢^[20]。Sirt1是Sirtuin家族中最流行的同源物,可防御关节软骨的氧化应激,调节软骨细胞凋亡自噬等,可改善OA进展^[21]。白藜芦醇作为公认的Sirt1特异性激活剂,可能通过激活Sirt1进一步发挥作用。研究^[22-23]发现:mTOR作为一种重要的自噬负调节因子,其介导的信号通路与OA的病程及发展有密切关联,使用mTOR抑制剂或特异性敲除该基因可极大地降低OA程度。其中,PI3K-Akt-mTOR作为调控mTOR的经典路径之一,在自噬的调控中发挥重要的作用^[24],提示白藜芦醇可能是通过激活Sirt1基因后,抑制PI3K-Akt-mTOR通路,从而激活自噬抑制凋亡,抑制OA发展。本研究结果显示:与模型组比较,白藜芦醇组大鼠TMJ组织中Sirt1蛋白表达水平升高,PI3K-Akt-mTOR通路相关蛋白表达水平降低。Sirt1 mRNA表达水平升高,PI3K、Akt和mTOR mRNA表达水平降低,与MARINO等^[25]的研究结果一致。

综上所述,白藜芦醇能够通过激活Sirt1抑制PI3K-Akt-mTOR通路,信号通路的抑制可能进一步导致软骨细胞自噬活动的增加,从而达到保护软骨细胞治疗TMJOA的效果。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

孙高参与文献检索、实验设计、数据整理、实验操作和论文撰写,何静、赵琪、石剑虹、廖智聆、田原野和吴国民参与文献检索及论文审校。

[参考文献]

- [1] STOCUM D L, ROBERTS W E. Part I: development and physiology of the temporomandibular joint[J]. Curr Osteoporos Rep, 2018, 16(4): 360-368.
- [2] LEE W S, KIM H J, KIM K I, et al. Intra-articular injection of autologous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for the treatment of knee osteoarthritis: a phase II b, randomized, placebo-controlled clinical trial[J]. Stem Cells Transl Med, 2019, 8(6): 504-511.
- [3] HAMERMAN D. The biology of osteoarthritis[J]. N Engl J Med, 1989, 320(20): 1322-1330.
- [4] ZHAO Y, GAN Y H. Combination of hyperlipidemia and 17 β -Estradiol induces TMJOA-like pathological changes in rats[J]. Oral Dis, 2023, 29(8): 3640-3653.
- [5] STOUSTRUP P, TWILT M. Therapy. Intra-articular steroids for TMJ arthritis: caution needed[J]. Nat Rev Rheumatol, 2015, 11(10): 566-567.
- [6] ENGLUND M, ROOS E M, LOHMANDER L S. Impact of type of meniscal tear on radiographic and symptomatic knee osteoarthritis: a sixteen-year followup of meniscectomy with matched controls[J]. Arthritis Rheum, 2003, 48(8): 2178-2187.
- [7] ZHANG S P, YAP A U J, TOH W S. Stem cells for

- temporomandibular joint repair and regeneration [J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2015, 11(5): 728-742.
- [8] BIASUTTO L, MATTAREI A, AZZOLINI M, et al. Resveratrol derivatives as a pharmacological tool [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2017, 1403(1): 27-37.
- [9] KURŠVIETIENĖ L, STANEVIČIENĖ I, MONGIRDIENĖ A, et al. Multiplicity of effects and health benefits of resveratrol [J]. *Medicina*, 2016, 52(3): 148-155.
- [10] LIN T C, LIN J N, YANG I H, et al. The combination of resveratrol and *Bletilla striata* polysaccharide decreases inflammatory markers of early osteoarthritis knee and the preliminary results on LPS-induced OA rats [J]. *Bioeng Transl Med*, 2022, 8(4): e10431.
- [11] LONG Z Y, XIANG W, LI J, et al. Exploring the mechanism of resveratrol in reducing the soft tissue damage of osteoarthritis based on network pharmacology and experimental pharmacology [J]. *Evid Based Complementary Altern Med*, 2021, 2021: 9931957.
- [12] ZHOU Z Q, DENG Z H, LIU Y W, et al. Protective effect of SIRT1 activator on the knee with osteoarthritis [J]. *Front Physiol*, 2021, 12: 661852.
- [13] YUCE P, HOSGOR H, RENCBER S F, et al. Effects of intra-articular resveratrol injections on cartilage destruction and synovial inflammation in experimental temporomandibular joint osteoarthritis [J]. *J Oral Maxillofac Surg*, 2021, 79(2): 344.e1-344.e12.
- [14] IZAWA T, HUTAMI I R, TANAKA E. Potential role of rebamipide in osteoclast differentiation and mandibular condylar cartilage homeostasis [J]. *Curr Rheumatol Rev*, 2018, 14(1): 62-69.
- [15] LEI J, HAN J H, LIU M Q, et al. Degenerative temporomandibular joint changes associated with recent-onset disc displacement without reduction in adolescents and young adults [J]. *J Cranio Maxillo Facial Surg*, 2017, 45(3): 408-413.
- [16] YI H, ZHANG W, CUI Z M, et al. Resveratrol alleviates the interleukin-1 β -induced chondrocytes injury through the NF- κ B signaling pathway [J]. *J Orthop Surg Res*, 2020, 15(1): 424.
- [17] LI M, YUAN Z P, YU F, et al. Microfluidic-based screening of resveratrol and drug-loading PLA/Gelatin nano-scaffold for the repair of cartilage defect [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2018, 46(sup1): 336-346.
- [18] 褚云峰, 于红燕, 杨琪, 等. 白藜芦醇在骨关节炎中的作用及机制研究进展 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2022, 28(9): 1351-1355.
- [19] CORBI G, CONTI V, SCAPAGNINI G, et al. Role of sirtuins, calorie restriction and physical activity in aging [J]. *Front Biosci (Elite Ed)*, 2012, 4(2): 768-778.
- [20] YACOUB R, LEE K, HE J C. The role of SIRT1 in diabetic kidney disease [J]. *Front Endocrinol*, 2014, 5: 166.
- [21] FENG K, CHEN Z X, LIU P C, et al. Quercetin attenuates oxidative stress-induced apoptosis via SIRT1/AMPK-mediated inhibition of ER stress in rat chondrocytes and prevents the progression of osteoarthritis in a rat model [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(10): 18192-18205.
- [22] XUE J F, SHI Z M, ZOU J, et al. Inhibition of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway promotes autophagy of articular chondrocytes and attenuates inflammatory response in rats with osteoarthritis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 89: 1252-1261.
- [23] ZHANG Y, VASHEGHANI F, LI Y H, et al. Cartilage-specific deletion of mTOR upregulates autophagy and protects mice from osteoarthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2015, 74(7): 1432-1440.
- [24] XU Z R, HAN X, OU D M, et al. Targeting PI3K/AKT/mTOR-mediated autophagy for tumor therapy [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, 104(2): 575-587.
- [25] MARIÑO G, MORSELLI E, BENNETZEN M V, et al. Longevity-relevant regulation of autophagy at the level of the acetylproteome [J]. *Autophagy*, 2011, 7(6): 647-649.