

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.003259

异常机械负荷加重大鼠颞下颌关节骨关节炎的组织病理学研究

何 东¹, 李艳华², 姚红英¹

(1. 苏州大学附属儿童医院口腔科, 苏州 215000; 2. 苏州口腔医院牙周科, 苏州 215000)

【摘要】目的:研究异常机械负荷在大鼠颞下颌关节软骨退变中的作用。**方法:**36只8周龄雌性SD大鼠随机分为4组,分别为对照组(control group, Con组)、Ⅱ型胶原蛋白酶组(collagenase type Ⅱ group, CⅡ组)、大张嘴组(wide mouth opening group, MS组)和Ⅱ型胶原酶+大张嘴组(collagenase type Ⅱ+wide mouth opening group, CⅡ+MS组)。HE染色、番红O-固绿染色观测软骨组织病理学变化,免疫组化实验检测炎症因子基质金属蛋白酶3(matrix metalloproteinase 3, MMP3)和聚蛋白多糖酶5(a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 5, ADAMTS5)的表达。**结果:**与Con组相比,CⅡ、MS和CⅡ+MS组大鼠颞下颌关节软骨后区总厚度、钙化层厚度和番红O阳性面积比均显著降低(均 $P<0.05$),CⅡ、MS和CⅡ+MS组中MMP3和ADAMTS5的阳性表达均显著增高(均 $P=0.000$);与CⅡ和MS组相比,CⅡ+MS组软骨钙化层厚度显著降低(均 $P=0.000$),ADAMTS5表达显著增高(均 $P=0.000$);MS和CⅡ+MS组软骨后区潮线呈波浪状。**结论:**异常机械负荷促使髁突软骨后区退变及改建,这将有助于异常负荷致颞下颌关节骨关节炎的机制研究。

【关键词】颞下颌关节;骨关节炎;Ⅱ型胶原蛋白酶;机械负荷

【中图分类号】R782.6

【文献标志码】A

【收稿日期】2022-09-13

Histopathology of temporomandibular joint osteoarthritis in rats under abnormal mechanical load

He Dong¹, Li Yanhua², Yao Hongying¹

(1. Department of Stomatology, Children's Hospital of Soochow University; 2. Department of Periodontology, Suzhou Stomatological Hospital)

【Abstract】Objective: To investigate the impact of abnormal mechanical load on cartilage degeneration of the temporomandibular joint (TMJ) in rats. **Methods:** A total of 36 female Sprague-Dawley rats, aged 8 weeks, were randomly divided into control group (Con group), collagenase type Ⅱ group (CⅡ group), wide mouth opening group (MS group), and collagenase type Ⅱ+wide mouth opening group (CⅡ+MS group). HE staining and safranin O-fast green staining were used to observe the histopathological changes of cartilage, and immunohistochemistry was used to measure the expression levels of the inflammatory factors matrix metalloproteinase 3 (MMP3) and A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 5 (ADAMTS5). **Results:** Compared with the Con group, the CⅡ, MS, and CⅡ+MS groups had significant reductions in the total thickness, calcified layer thickness, and safranin O-positive area ratio of the TMJ posterior zone ($P<0.05$) and significant increases in the positive expression of MMP3 and ADAMTS5 ($P=0.000$). Compared with the CⅡ and MS groups, the CⅡ+MS group had a significant reduction in the calcified layer thickness of cartilage ($P=0.000$) and a significant increase in the expression of ADAMTS5 ($P=0.000$). The MS and CⅡ+MS groups had a wavy tidal line in the posterior zone of cartilage. **Conclusion:** Abnormal mechanical load promotes the degeneration and reconstruction of the posterior zone of condylar cartilage, which may help with the research on the mechanism of TMJ osteoarthritis caused by abnormal mechanical load.

【Key words】 temporomandibular joint; osteoarthritis; collagenase type Ⅱ; mechanical load

作者介绍:何 东, Email: hedong0910@163.com,

研究方向:颞下颌关节骨关节炎。

通信作者:姚红英, Email: 40149671@qq.com。

基金项目:苏州市“科教兴卫”青年科技资助项目(编号:KJXW2019021);

苏州市医学重点扶持学科资助项目(编号:SZFCXK202125)。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms2/detail/50.1046.R.20230710.0955.023.html>

(2023-07-10)

颞下颌关节骨关节炎(temporomandibular joint osteoarthritis, TMJ-OA)是一种常见的骨关节病。它的特点是软骨退变、软骨下骨改建和骨赘形成^[1]。异常负荷是TMJ-OA的关键诱因,适当的负荷对于TMJ组织的生长发育必不可少,但过度负荷会严重损害关节组织^[2]。Fujisawa T等^[3]运用大张嘴方式建立了稳定的兔TMJ-OA模型。胶原和聚集蛋白聚糖是软骨细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的关键结构成分,它们的降解是早期骨关节炎(osteoarthritis, OA)的标志^[4],主要归因于基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)和聚蛋白多糖酶(a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs, ADAMTS)对聚集蛋白聚糖蛋白内特定位点的切割作用^[5]。本研究拟通过关节腔内注射Ⅱ型胶原蛋白酶(collagenase type II, C II)诱导TMJ-OA模型,通过自制口外加力装置给大鼠颞下颌关节加载超负荷应力,观测异常机械负荷对髁突软骨组织病理学和髁突软骨中炎症因子表达的变化。

1 材料与方法

1.1 实验动物

本实验选取180~200 g雌性SD大鼠,购于昭衍(苏州)新药研究中心有限公司,许可证号:SCXK(苏)2018-0006,于苏州大学附属儿童医院动物中心普通环境进行饲养及实验,提供充足食物和水,适宜温度下适应性饲养1周后用于实验。所有动物实验均通过苏州大学附属儿童医院动物伦理委员会审批。

1.2 TMJ-OA模型建立方法及实验分组

1.2.1 模型建立方法 实验前大鼠常规禁食禁水12 h, 10%水合氯醛(0.3 mL/100g)进行麻醉。右侧TMJ关节腔内分别于第1、4、7天注射1% C II 50 μ L;使用0.8 mm直径的不锈钢丝弯制大张嘴(wide mouth opening, MS)装置^[6],张嘴度控制在2 cm,分别于第1、4、7、10和13天进行MS操作,每次2 h。实验周期均为2周。MS操作方法见图1A、B。

1.2.2 实验分组 36只雌性SD大鼠随机分为4组:对照组(control group, Con组),无特殊处理;C II组,右侧TMJ关节腔内分别于1、4、7天注射1% C II 50 μ L;MS组:分别于第1、4、7、10和13天进行大张嘴操作;C II+MS组:分别于第1、4、7天注射1% C II 50 μ L,第1、4、7、10和13天进行MS操作。以上操作均在大鼠麻醉状态下进行。

1.3 动物取材及处理

实验结束后,所有大鼠注射过量10%水合氯醛麻醉剂处死,完整切取大鼠右侧颞下颌关节,适当去除标本周围软

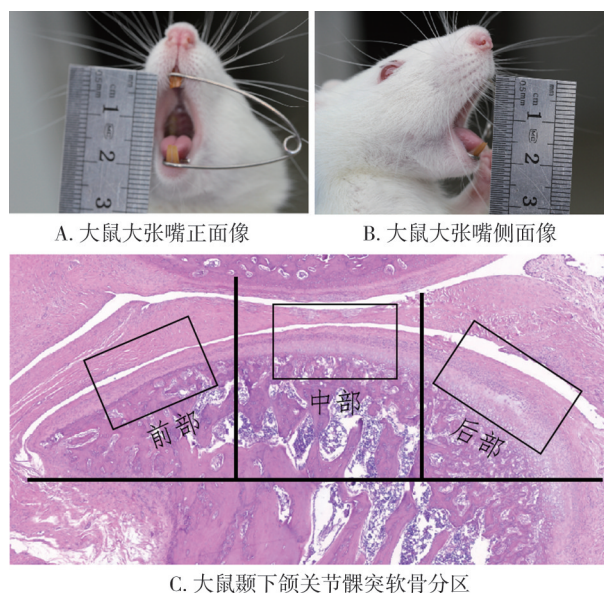


图1 大鼠TMJ异常机械负荷加载方法及髁突软骨分区示意图

硬组织,保持关节囊的完整性。4%多聚甲醛固定24 h,将每组中6只大鼠TMJ在酸性脱钙液中脱钙7 d,属于快速脱钙,用于组织形态研究;另3只大鼠关节于10% EDTA中性脱钙液脱钙6周,10% EDTA脱钙可保存组织蛋白的抗原活性,适用于免疫组化实验,颞下颌关节骨组织脱钙方式区别与选择具体参见文献^[7]。常规石蜡包埋,切片厚度均为4 μ m。

1.4 HE染色

石蜡切片脱蜡至水,常规HE染色,全景扫描仪3DHISTECH (3DHISTECH P250 FLASH)采集图像,Case-Viewer软件在200倍视野下的软骨后部分别测量全层和钙化层厚度。髁突软骨分部示意图见图1C。

1.5 番红O-固绿染色

石蜡切片脱蜡至水,参照番红O-固绿染色试剂盒(索莱宝,改良番红O-固绿软骨染色试剂盒, G1371)进行常规染色操作,采集切片全景图像,运用Image Pro Plus 6.0软件在200倍视野下的软骨后部计算每个样本的番红O着色面积百分比。

1.6 免疫组化染色

石蜡切片脱蜡至水,按照常规SABC法进行免疫组化。本实验使用抗体:MMP3抗体(1:100,索莱宝, K111452P); ADAMTS5抗体(1:50,索莱宝, K107480P)。运用Image Pro Plus 6.0软件在200倍视野下软骨后带随机选取5个等大区域,要求覆盖软骨全层,计算平均光密度值(mean of integrated option density, 平均IOD)。

1.7 统计学处理

数据分析采用SPSS 22.0软件。所有数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)的形式表示,经Levene方差齐性检验,多组之间的差异采取One-way ANOVA检验,两两比较采取Tukey检验,不满足方差齐性时选用Games-Howell法进行两两比较。检

验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 C II 或(和)MS 可致髌突软骨退变

Con 组: 关节软骨结构完整, 表面平滑, 软骨细胞外基质着色正常, 潮线平滑; C II 组: 关节软骨表面纤维化, 稍有破损, 见软骨浅层裂隙, 软骨全层及钙化层厚度较 Con 组变薄, 软骨细胞外基质着色丢失; MS 组: 关节软骨表面纤维化, 后部软骨全层厚度及钙化层厚度降低, 潮线呈波浪状(黑色虚线); C II + MS 组: 纤维层软骨见浅裂隙, 软骨基质染色变浅, 软骨全层及钙化层厚度显著降低, 潮线呈波浪状(黑色虚线); 结果如图 2、图 3 所示。C II 或(和)MS 组髌突软骨均出现早期 OA 样病损, C II 组主要观察到软骨 ECM 降解, MS 组异常机械应力促进了髌突软骨改建, MS 和 C II + MS 组可见潮线不平整, 呈波浪状, 并加重了髌突软骨基质退变。但

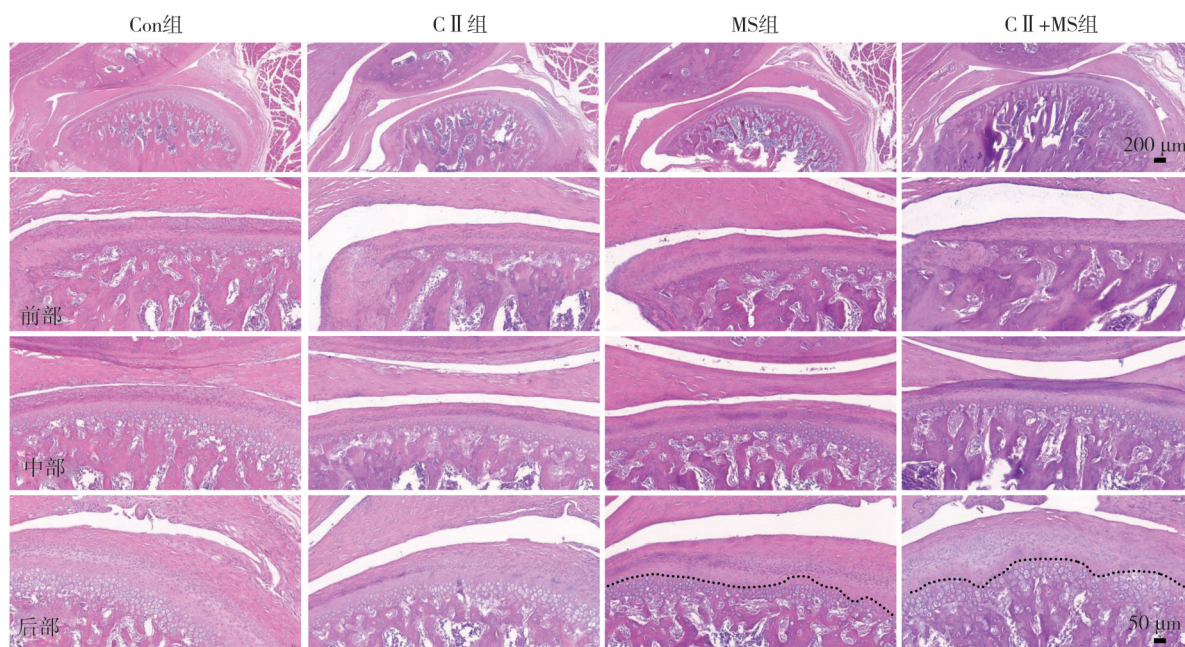
本实验未观察到软骨缺损、剥脱或其他较为严重的 OA 样病损, 这可能与本研究使用的致病因素较轻和作用时间较短有关。

2.2 C II 或(和)MS 可致髌突软骨中 MMP3 和 ADAMTS5 表达增加

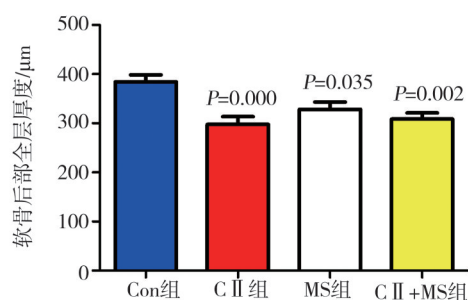
免疫组化染色结果: C II 或(和)MS 组中 MMP3、ADAMTS5 平均 IOD 值显著高于 Con 组(均 $P=0.000$); 且 C II 和 C II + MS 组 MMP3 平均 IOD 值显著高于 MS 组($P=0.000$, $P=0.019$); C II + MS 组 ADAMTS5 平均 IOD 值显著高于 C II 组和 MS 组(均 $P=0.000$), 结果如图 4 所示。

3 讨论

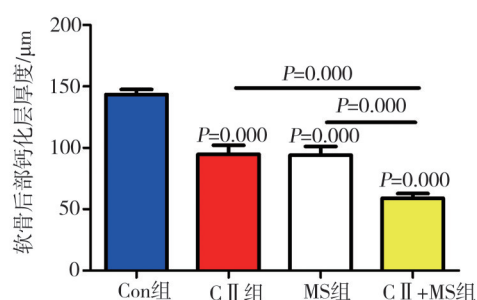
目前, 研究 OA 的动物造模方法^[8]大致包括以下 4 种: 注射药物、咬合诱导、外科手术和基因编辑。其中基因编辑动物模型因为经济成本高, 未得到广



A. 各组大鼠颞下颌关节髌突软骨HE染色

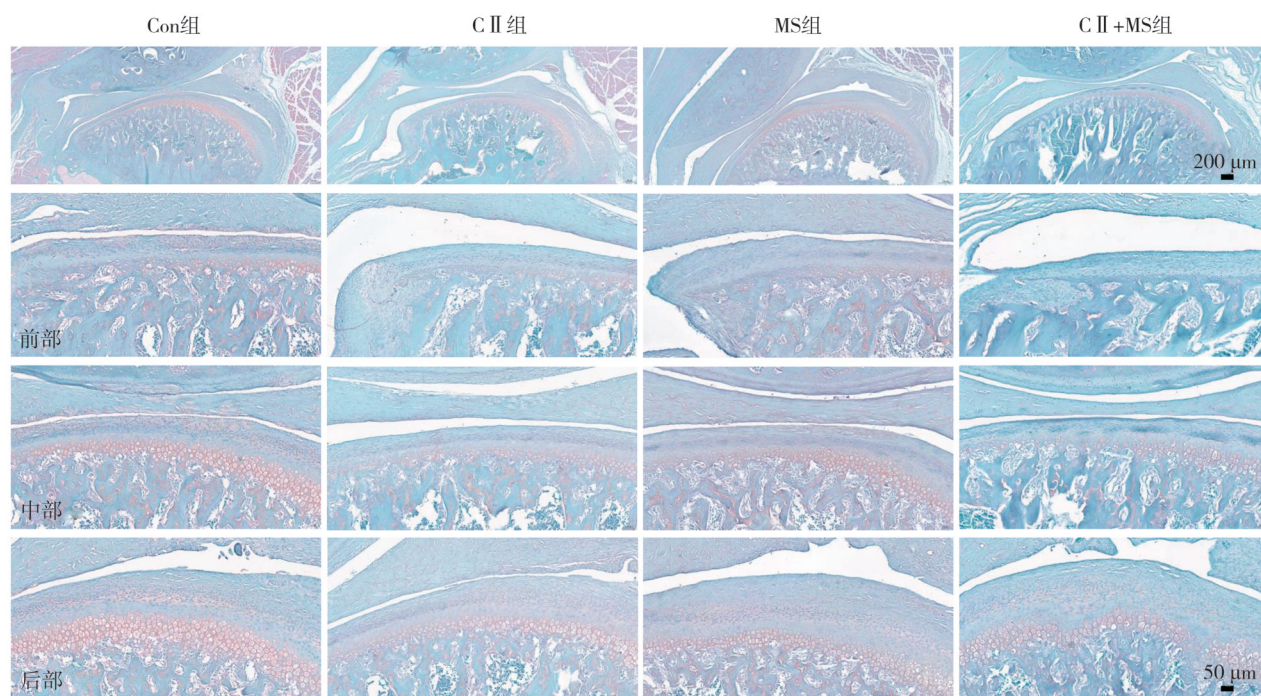


B. 各组软骨后部全层厚度

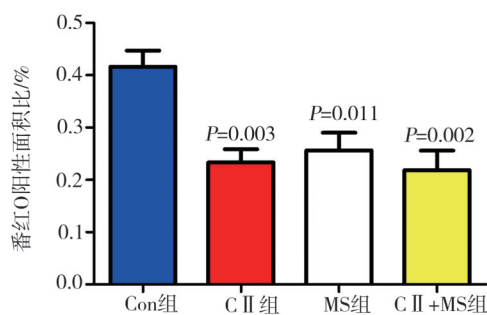


C. 各组软骨后部钙化层厚度

图2 颞下颌关节 HE 染色及软骨厚度



A. 大鼠颞下颌关节髁突软骨番红O-固绿染色



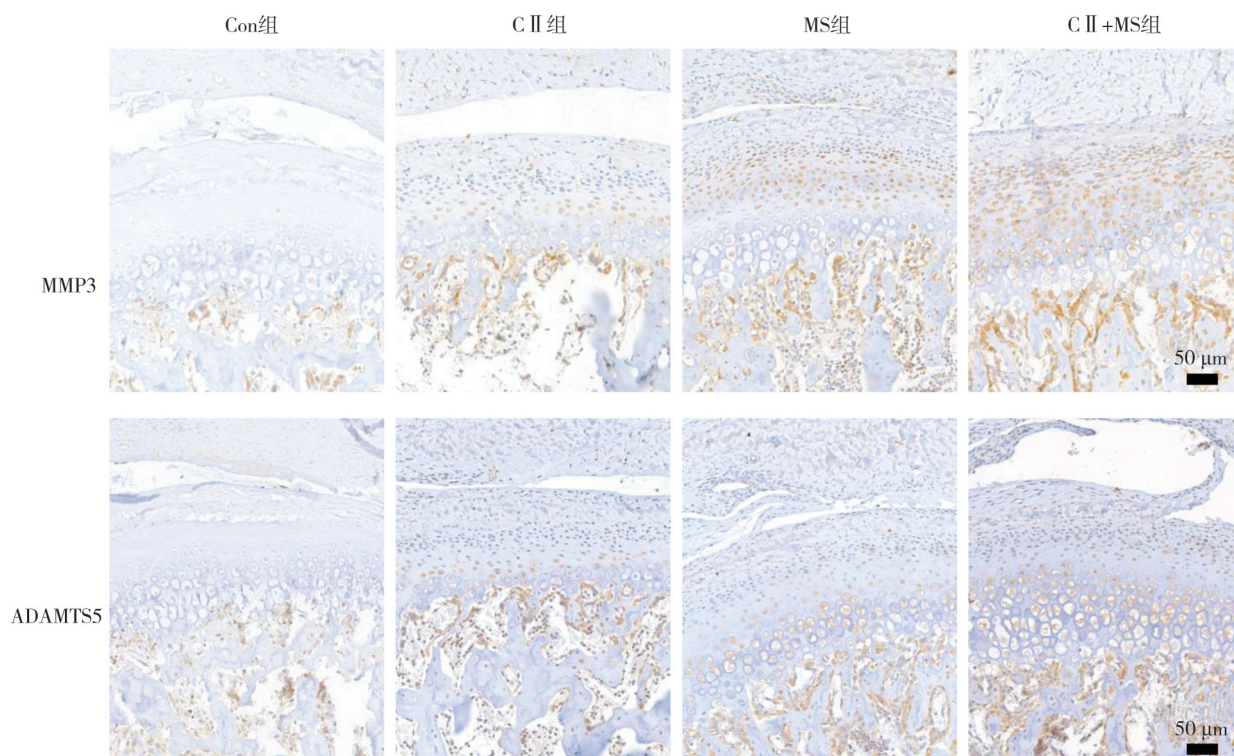
B. 各组番红O阳性面积比

图3 颞下颌关节番红O-固绿染色及番红O阳性面积比

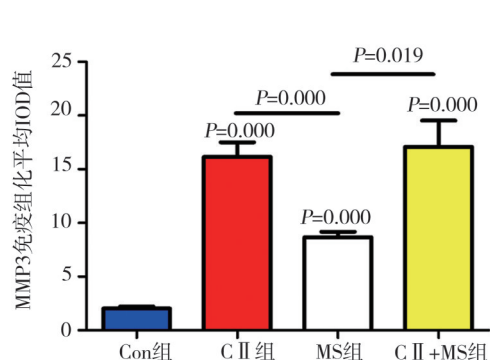
泛运用。而外科手术方式造成的OA更适合于创伤性关节病的研究,且造成的病损一般较重^[9]。注射药物的造模方法具有操作简单、成本低和速度快的特点而被广泛运用。最新一项研究运用C II关节内注射,30 d后观察到大鼠软骨血管新生、细胞数量减少和细胞外基质淡染等显著的OA病理损伤^[10]。咬合诱导包括正畸法移动牙齿、单侧咬合垫高、单侧前牙反颌和MS等,其中MS有着建模速度快、操作简单的优点。2018年,Wang GYF等^[11]运用自制橡胶块强迫小鼠MS的方法建模,发现持续张口会导致小鼠咬肌和颞下颌关节组织损伤,观察到巨噬细胞浸润。本实验运用不锈钢丝弯制的强迫开口装置,具有操作简单、材料易获取的优点,并能够根据实验动物个体大小调整开口度,可广泛应用于各

种动物的MS实验。本研究通过多次C II关节腔内注射的方法,实验2周即造成髁突软骨OA样病损:软骨表面不平整,软骨基质降解,软骨厚度降低。综上,使用C II注射和MS法均造成大鼠TMJ-OA病损,但其病理损伤又各有特点,之前鲜有研究将2种因素进行组合对比。本研究旨在探究机械作用对TMJ的作用,同时加入化学药物注射诱导法作为对比,可更加突显异常机械应力对颞下颌关节软骨及软骨下骨独特的改建作用。

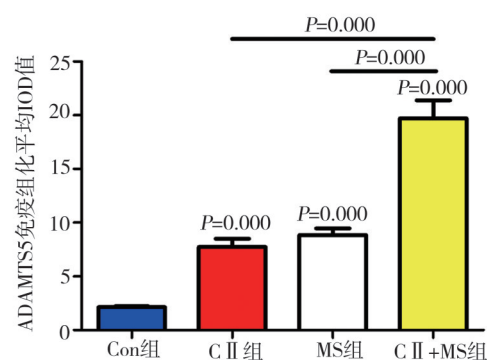
TMJ-OA的发病机制与机械应力^[12]密切相关。成人髁突软骨由浅至深可分为4层:纤维层、增殖层、肥大层和钙化软骨层,前三层合称非钙化软骨层,潮线为钙化与非钙化软骨之间的分界线。髁突软骨交界由钙化软骨层与软骨下板构成,这种结构



A. 各组髌突软骨免疫组化染色结果



B. 各组MMP3免疫组化平均IOD值



C. 各组ADAMTS5免疫组化平均IOD值

图4 颞下颌关节软骨中MMP3和ADAMTS5的免疫组化染色

可有效将压应力传导至软骨下骨。正常生理环境下,完整的钙化软骨层和潮线可以限制来自软骨下骨的物质扩散进入非钙化软骨,从而维持软骨生化微环境稳定。有研究运用MS法给予小鼠TMJ一定的机械负荷,发现髌突软骨能够通过适应性改建,形成更厚的软骨来响应机械负荷^[13]。机械应力刺激导致软骨细胞骨架重组,从而增加细胞收缩力和软骨细胞硬度,触发 αV 整合素介导的TGF β 激活,从而破坏软骨稳态^[14]。本研究发现髌突软骨加载机械负荷后软骨全层及钙化层厚度降低,潮线出现波浪

样改建,软骨出现退行性病变,推测可能与施加的机械力强度和时间超出髌突软骨适应性改建的限度有关。

TMJ-OA是常见的关节软骨退行性疾病,主要特点是颞下颌关节软骨ECM成分逐步退变。ECM可以通过与细胞相互作用产生内部牵引力,决定软骨细胞的机械性能^[15]。人TMJ软骨的ECM由胶原纤维网络和高电荷蛋白多糖组成,负电荷蛋白多糖的密集聚集体通过亲水性促进渗透膨胀来提供抗压压缩负荷能力,而渗透膨胀又被赋予组织抗拉强度

的交联胶原纤维所抵消,这种特殊的结构赋予TMJ独特的承载功能。这种平衡的破坏最终会导致关节软骨的结构破坏和功能紊乱,从而导致并促进TMJ-OA的发生发展^[16-17]。关节软骨ECM的降解主要由细胞外基质降解酶调控,包括MMP和ADAMTS。研究发现,ADAMTS5是降解ECM的主要聚蛋白多糖酶^[18]。另有研究证明ADAMTS5活性的缺失显著阻止小鼠软骨退化的进展^[19]。在接下来的研究中,MMP3也被证明可有效降解ECM^[20]。本研究发现CⅡ或(和)机械应力诱导软骨胶原蛋白降解,均能致使软骨退变,且MMP3和ADAMTS5表达增加,这表明CⅡ或(和)机械应力的作用可能促进了炎症因子的表达,从而降解ECM,具体机制有待进一步研究。

综上所述,颞下颌关节骨关节的发病机制与异常的机械应力密切相关,关于机械负荷诱导的颞下颌关节重塑中涉及的分子调控机制研究还不完善。本研究发现异常的机械负荷导致髁突软骨改建并且厚度显著降低,相关炎症标志蛋白表达水平显著增高,通过与CⅡ建模对比,发现机械应力异常可特异性造成关节软骨与软骨下骨界面不平整。进一步了解机械负荷控制下颌骨髁突软骨重塑的机制,有助于TMJ退行性疾病的机制研究,也有助于颞下颌关节疾病康复治疗措施的制定。

参 考 文 献

- [1] Delpachitra SN, Dimitroulis G. Osteoarthritis of the temporomandibular joint: a review of aetiology and pathogenesis[J]. Br J Oral Maxillofac Surg, 2022, 60(4): 387-396.
- [2] Chen J, Sorensen KP, Gupta T, et al. Altered functional loading causes differential effects in the subchondral bone and condylar cartilage in the temporomandibular joint from young mice[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2009, 17(3): 354-361.
- [3] Fujisawa T, Kuboki T, Kasai T, et al. A repetitive, steady mouth opening induced an osteoarthritis-like lesion in the rabbit temporomandibular joint[J]. J Dent Res, 2003, 82(9): 731-735.
- [4] Maldonado M, Nam J. The role of changes in extracellular matrix of cartilage in the presence of inflammation on the pathology of osteoarthritis[J]. Biomed Res Int, 2013, 2013: 284873.
- [5] Durigova M, Nagase H, Mort JS, et al. MMPs are less efficient than ADAMTS5 in cleaving aggrecan core protein[J]. Matrix Biol, 2011, 30(2): 145-153.
- [6] Sobue T, Yeh WC, Chhibber A, et al. Murine TMJ loading causes increased proliferation and chondrocyte maturation[J]. J Dent Res, 2011, 90(4): 512-516.
- [7] Miquelstorena-Standley E, Jourdan ML, Collin C, et al. Effect of decalcification protocols on immunohistochemistry and molecular analyses of bone samples[J]. Mod Pathol, 2020, 33(8): 1505-1517.
- [8] Li BC, Guan GZ, Mei L, et al. Pathological mechanism of chondrocytes and the surrounding environment during osteoarthritis of temporomandibular joint[J]. J Cell Mol Med, 2021, 25(11): 4902-4911.
- [9] Meng JH, Ma XC, Ma DL, et al. Microarray analysis of differential gene expression in temporomandibular joint condylar cartilage after experimentally induced osteoarthritis[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2005, 13(12): 1115-1125.
- [10] Barry F, Chai F, Chijcheapaza-Flores H, et al. Comparison of chemical-induced temporomandibular osteoarthritis rat models (monosodium iodoacetate versus collagenase type II) for the study of prolonged drug delivery systems[J]. PLoS One, 2023, 18(1): e0281135.
- [11] Wang GYF, Shi XQ, Wu WJ, et al. Sustained and repeated mouth opening leads to development of painful temporomandibular disorders involving macrophage/microglia activation in mice[J]. Pain, 2018, 159(7): 1277-1288.
- [12] Yokota H, Leong DJ, Sun HB. Mechanical loading: bone remodeling and cartilage maintenance[J]. Curr Osteoporos Rep, 2011, 9(4): 237-242.
- [13] Utreja A, Dymont NA, Yadav S, et al. Cell and matrix response of temporomandibular cartilage to mechanical loading[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2016, 24(2): 335-344.
- [14] Zhen GH, Guo QY, Li YS, et al. Mechanical stress determines the configuration of TGFβ activation in articular cartilage[J]. Nat Commun, 2021, 12: 1706.
- [15] DuFort CC, Paszek MJ, Weaver VM. Balancing forces: architectural control of mechanotransduction[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011, 12(5): 308-319.
- [16] Heinegård D, Saxne T. The role of the cartilage matrix in osteoarthritis[J]. Nat Rev Rheumatol, 2011, 7(1): 50-56.
- [17] Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, et al. Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ[J]. Arthritis Rheum, 2012, 64(6): 1697-1707.
- [18] Stanton H, Rogerson FM, East CJ, et al. ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse cartilage *in vivo* and *in vitro*[J]. Nature, 2005, 434(7033): 648-652.
- [19] Glasson SS, Askew R, Sheppard B, et al. Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis[J]. Nature, 2005, 434(7033): 644-648.
- [20] Wang GW, Wang MQ, Wang XJ, et al. Changes in the expression of MMP-3, MMP-9, TIMP-1 and aggrecan in the condylar cartilage of rats induced by experimentally created disordered occlusion[J]. Arch Oral Biol, 2010, 55(11): 887-895.

(责任编辑:唐秋姗)