

·论著·

心理应激对SD大鼠颞下颌关节髁突软骨细胞凋亡及Caspase-3表达的影响

郑程东^{1,2,3}, 张媛媛⁴, 张海娟^{1,2,3}, 韩妍冬^{1,2}, 于传垒^{1,2}, 陈鹤玲^{1,2,3}, 王爽^{1,2,3}

(1.西安交通大学口腔医院陕西省颅颌面精准医学研究重点实验室 陕西 西安 710004; 2.西安交通大学口腔医院陕西省牙颌面疾病临床研究中心 陕西 西安 710004; 3.西安交通大学口腔医院口腔正畸科 陕西 西安 710004; 4.可丽尔医疗科技常州有限公司 江苏 常州 213145)

[摘要]目的: 本研究旨在探讨单纯心理应激对大鼠颞下颌关节髁突软骨细胞凋亡及Caspase-3表达的影响。方法: 通过建立大鼠的单纯心理应激动物模型, 并采用HE染色、TUNEL法和免疫组织化学等实验方法观察不同时间点下大鼠颞下颌关节软骨的组织学变化、软骨细胞凋亡情况以及Caspase-3在软骨中的表达变化。结果: 与对照组相比, 在心理应激1周、3周和5周后, 实验组大鼠出现显著的行为学改变, 体重增长量略有减少但差异无统计学意义($P>0.05$); 旷场实验和高架实验表明心理应激组大鼠的焦虑水平增高($P<0.05$); 组织学分析发现, 心理应激导致软骨结构损伤, 软骨细胞凋亡率增加, 且随应激时间延长而加剧($P<0.05$); Caspase-3的表达也随应激时间的延长而增加, 但在恢复期有所下降($P<0.05$)。结论: 单纯心理应激可引起颞下颌关节髁突软骨病理性改变, 可能与关节软骨内Caspase-3表达增加及软骨细胞过度凋亡有关。

[关键词]心理应激; 颞下颌关节; 颞下颌关节紊乱病; 髁突软骨; 细胞凋亡; Caspase-3

[中图分类号]R782.6 **[文献标志码]**A **[文章编号]**1008-6455(2025)03-0007-07

The Effects of Psychological Stress on Apoptosis of Condylar Chondrocytes in Temporomandibular Joint and Expression of Caspase-3 in Rats

ZHENG Chengdong^{1,2,3}, ZHANG Yuanyuan⁴, ZHANG Haijuan^{1,2,3}, HAN Yandong^{1,2}, YU Chuanlei^{1,2}, CHEN Heling^{1,2,3}, WANG Shuang^{1,2,3}

(1.Key Laboratory of Shaanxi Province for Craniofacial Precision Medicine Research, College of Stomatology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi, China; 2.Clinical Research Center of Shaanxi Province for Dental and Maxillofacial Diseases, College of Stomatology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi, China; 3.Department of Orthodontics, College of Stomatology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi, China; 4. ClearMed Technology Co., Ltd, Changzhou 213145, Jiangsu, China)

Abstract: Objective This study aimed to explore the effects of simple psychological stress on the apoptosis of condylar chondrocytes and the expression of Caspase-3 in rats. **Methods** The histological changes in rat TMJ cartilage, chondrocyte apoptosis, and Caspase-3 expression post-stress will be examined using a psychological stress model in rats with HE staining, TUNEL assay, and immunohistochemistry. **Results** The results showed that compared with the control group, significant behavioral changes were observed in the experimental group rats after 1 week, 3 weeks, and 5 weeks of psychological stress($P>0.05$). There was a slight reduction in body weight gain but no statistical difference, open field and elevated tests indicated that the anxiety level of rats in the psychological stress group increased($P<0.05$). Histological analysis found that psychological stress led to damage of cartilage structure and increase in chondrocyte apoptosis rate, which worsened with the extension of stress time($P<0.05$). The expression of Caspase-3 also increased with the extension of stress time, but decreased in the recovery period($P<0.05$). **Conclusion** This indicates that simple psychological stress can cause pathological changes in the condylar cartilage of the temporomandibular joint, which may be related to increased expression of Caspase-3 in the articular cartilage and excessive apoptosis of chondrocytes.

Key words: psychological stress; temporomandibular joint; temporomandibular joint disorder; condylar cartilage; apoptosis; Caspase-3

通信作者: 王爽, 主任医师、教授、博士生导师; 研究方向为颞下颌关节紊乱病。E-mail: wshuang@mail.xjtu.edu.cn

第一作者: 郑程东, 主治医师; 研究方向为颞下颌关节紊乱病。E-mail: zheng890601@126.com

颞下颌关节紊乱病 (Temporomandibular disorders, TMD) 是指在颞下颌关节区周围主要特征为疼痛、异常关节音及下颌运动功能障碍。颞下颌关节紊乱病是一种病因复杂的多因素疾病, 与咬合关系紊乱、损伤、自身免疫、心理因素不良、咀嚼习惯、关节局部解剖异常等多种因素相关^[1]。TMD的发生还与患者持续的精神紧张、焦虑、抑郁、愤怒等心理应激反应相关。应激是指机体在受到各种内外环境因素刺激时所出现的非特异性全身反应。适当的刺激因素有益于身体健康, 然而当心理应激过度或慢性应激时, 则可以导致代谢紊乱、器官功能失调, 诱发心血管疾病、糖尿病、肿瘤、消化系统疾病等多种疾病^[2-7]。

流行病学调查和动物实验均表明心理应激可以引起颞下颌关节的病理性改变^[8]。颞下颌关节紊乱常伴有关节软骨破坏, 软骨下骨改变等器质性病变。软骨细胞是关节软骨内唯一的细胞成分, 其数目和功能决定了软骨健康与否。软骨细胞的正常凋亡是调控软骨生长发育、控制软骨细胞功能、稳定关节内微环境所必需的一种生理过程。正常情况下, 软骨细胞处于增殖和凋亡的动态平衡中, 然而一旦由于某些因素导致细胞发生病理性过度凋亡, 则会打破这一平衡, 导致软骨结构和功能异常^[9]。软骨细胞过度凋亡是引起骨关节炎的一个重要机制。Caspase是引起细胞凋亡的关键, 在细胞凋亡机制网络中处于核心地位^[10-11]。Caspase-3是各种凋亡途径的共同下游效应部分^[12-13], 在细胞凋亡的过程中具有重要作用^[14-17]。

心理应激导致TMD病理改变的分子生物学机制目前尚无定论。凋亡分子Caspase-3的表达变化及软骨细胞的凋亡在心理应激引发TMD中的作用目前少见报道。本研究通过建立大鼠的单纯心理应激动物模型, 探讨单纯心理应激对大鼠的颞下颌关节软骨组织及软骨细胞凋亡和Caspase-3表达的影响, 为TMD分子生物学发病机制提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物: 选取72只7周龄SPF级SD大鼠, 雄性, 体重160~200 g, 由西安交通大学医学院实验动物中心提供。检查SD大鼠精神行为无异常, 咬合无异常, 可正常进食, 无明显全身疾患。

1.2 实验设备及试剂: 脱水机 (武汉俊杰电子有限公司JJ-12J)、包埋机 (武汉俊杰电子有限公司JB-P5)、病理切片机 (上海徕卡仪器有限公司RM2016)、冻台 (武汉俊杰电子有限公司JB-L5)、组织摊片机 (浙江省金华市科迪仪器设备有限公司KD-P)、烤箱 (天津市莱玻瑞仪器设备有限公司GFL-230)、载玻片 (Servicebio)、正置光学显微镜 (日本尼康Nikon Eclipse E)、成像系统 (日本尼康Nikon DS-U3)、掌上数字万用表 (UT33B+, 优利德电子有限公司)、调压器 (TDGC-0.5K)、无水乙醇 (国药集团化学试剂有限公司100092683)、二甲苯 (国药集团化学试剂有限公司10023418)、HE染液 (Servicebio G1005)、

分化液 (Servicebio G1005-3)、返蓝液 (Servicebio G1005-4)、中性树胶 (国药集团化学试剂有限公司10004160)

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组: 将72只SD大鼠随机分为心理应激组 (Psychological Stress Group)、足部电击组 (Foot Shock Group) 和空白对照组, 每组24只, 其中心理应激组又分为心理应激1周组、心理应激3周组、心理应激5周组和应激恢复组 (应激5周后停止应激, 自然恢复4周), 每组6只; 空白对照组分为空白对照1周组、空白对照3周组、空白对照5周组和应激恢复空白对照组 (连续9周均不进行心理应激的空白对照组), 每组6只; 剩余24只足部电击组作为心理应激组的刺激源进行足部电击。

1.3.2 单纯心理应激模型建立: 心理应激交流箱最早由Gomita Y^[18]设计制作, 本实验所采用的交流箱是由贾克然等^[19]所设计的小鼠心理应激交流箱改进而来的。相比较其他造模方法而言, 单纯心理应激交流箱法可以有效避免动物躯体应激, 能够更准确地模仿人类情绪。心理应激交流箱用透明有机玻璃板分为36个小室。临近应激组大鼠可以看到其他大鼠被电击的过程, 板上设置透气孔可以接收到足部电击组大鼠的声音和气味信息。心理应激交流箱的底板铺有导电丝, 调压器控制电击强度, 导电丝电压为30 V, 足部电击组大鼠直接与底板接触, 心理应激组大鼠所处的小室底部放置绝缘有机玻璃板。

实验开始前1周, 各组动物分笼饲养, 6只/笼, 保证相同的饲养条件, 每日放入心理应激箱中适应环境, 不进行电击刺激。实验开始后, 将三组大鼠分别放入到心理应激箱相应的格子中。每天上午9:00~11:00进行实验, 电压30 V, 通电持续5 s, 两次通电间隔30 s, 每天实验共持续30 min。

1.3.3 体重测量: 各组SD大鼠分别于实验前及实验开始后1、3、5、9周末测量体重, 计算体重增长量。

1.3.4 旷场实验箱: 大鼠旷场反应箱边长100 cm, 高35 cm, 由黑色不反光板制成。实验时需防止噪音干扰。每只大鼠结束后需彻底打扫旷场内余留物。SMART 3.0软件对其中央停留时间和旷场内移动总距离进行统计并分析。当大鼠在旷场内中央停留时间和旷场内移动总距离发生显著性改变时, 即可认为造模成功, 大鼠处于心理应激的状态。

1.3.5 高架十字迷宫: 由两条开放臂和两条闭合臂及中央区连接而成, 开放臂周围无围栏阻挡, 开放臂和闭合臂底面为长方形。将SD大鼠放入高架十字迷宫的中央区, 同时进行摄像和计时, 每只大鼠观察5 min, 用SMART 3.0软件对大鼠进入开放臂的次数 (Open arm entry, OE), 进入闭合臂的次数 (Closed arm entry, CE), 分别记录在开放臂停留的时间 (Open arm time, OT) 和闭合臂停留的时间 (Closed arm time, CT)。OE%=OE/(OE+CE)×100%、OT%=OT/(OT+CT)×100%。OE%及OT%减少反映大鼠焦虑情

绪加重。

1.3.6 髌突组织HE染色：分别于实验开始1周、3周和5周、9周末处死相应的空白对照组、心理应激组和应激恢复组大鼠。每只大鼠取单侧颞下颌关节，编号单数取左侧，双数取右侧。将所得关节用生理盐水冲洗后放入4%多聚甲醛固定液，固定48 h。固定结束后使用15%的EDTA脱钙8周。依次放入不同浓度（75%、85%、90%、95%）的酒精中4 h、2 h、2 h、1 h。取出后再放入到无水乙醇和二甲苯中继续脱水。脱水后包埋浸蜡组织，切片4 μm 。脱蜡并苏木素染色和伊红染色，使用中性树胶用来封片。

1.3.7 TUNEL染色：染色前对石蜡切片进行脱蜡，依次放入有机溶剂中并使用蒸馏水仔细清洗。确保液体甩干，使用蛋白酶K工作液修复组织，使用破膜工作液破膜，修复和破膜操作后都需要使用PBS洗涤3次，每次3 min。将Tunel试剂盒中TdT和DUTP按照1:9的比例进行混合，覆盖组织，37°孵育2 h，PBS洗片，方法同上，使用DAPI复染细胞核，室温下避光孵育10 min。再次使用PBS清洗，甩干，用抗荧光淬灭封片剂封片。镜下观察，扫描并分析图像。

1.3.8 Caspase-3免疫组化染色：石蜡切片脱蜡，依次放入有机溶剂中并使用蒸馏水仔细清洗甩干，使用柠檬酸抗原修复缓冲液（PH 6.0）抗原修复。3%过氧化氢溶液阻断内源性过氧化物酶。3%BSA室温封闭组织，一抗稀释比例为1:500，4℃过夜。二抗室温孵育。DAB显色液，在显微镜下观察组织内棕黄色表达，控制染色时间，水洗终止染色。Harris苏木素复染细胞核，流水冲洗后再用1%的盐酸酒精进行分化，重复冲洗，氨水返蓝后再冲洗。染色完成后进行封片，镜下观察，扫描并分析图像。

1.4 统计学分析：采用SPSS 20.0统计软件进行，相同时段组间比较采用独立样本 t 检验，检验水准 $\alpha=0.05$ ， $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠行为表现：所有大鼠放入心理应激箱中且未通电时，大鼠鼻嗅四周，直立探索，未见跳跃，喊叫情况（见图1A）。通电后，足部电击组大鼠在小室内跳跃次数明显增加，呼吸急促，大声尖叫（见图1B）。心理应激组大鼠受到四周相邻电击鼠行为刺激后，直立、探索行为消失，蜷缩，竖毛，处于明显恐惧状态（见图1C）。

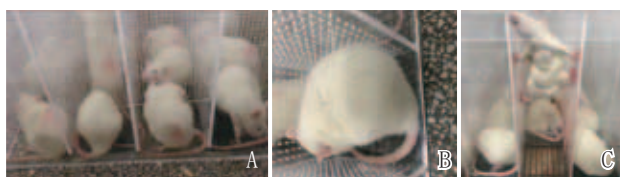


图1 大鼠在心理应激箱中的行为表现

2.2 大鼠体重增长量：大鼠体重增长量为各时间点所测得体重减去实验开始前大鼠初始体重。结果显示，随着时间增

加，各组大鼠平均体重均呈增加趋势，总体来看心理应激组1、3、5周及应激恢复期大鼠与同期空白对照组大鼠相比，体重增量略有减少，但结果差异无统计学意义（ $P>0.05$ ）。见表1。

表1 两组不同时间大鼠体重增长量比较（ $n=6$ ， $\bar{x}\pm s$ ，g）

组别	1周	3周	5周	应激恢复期
心理应激组	35.23 \pm 18.65	71.68 \pm 7.04	99.63 \pm 22.33	178.97 \pm 40.53
空白对照组	39.85 \pm 14.66	79.62 \pm 38.90	110.13 \pm 19.79	177.07 \pm 42.58
t 值	-0.477	-0.492	-0.862	0.079
P 值	0.644	0.642	0.409	0.938

2.3 旷场实验：旷场中央区域停留时间心理应激1周组、3周组、5周组的旷场中央区域停留时间与空白对照1周组、3周组、5周组相比明显增加，差异具有统计学意义（ $P<0.05$ ），心理应激恢复组与应激恢复对照组相比，差异无统计学意义（ $P>0.05$ ）（见图2）。

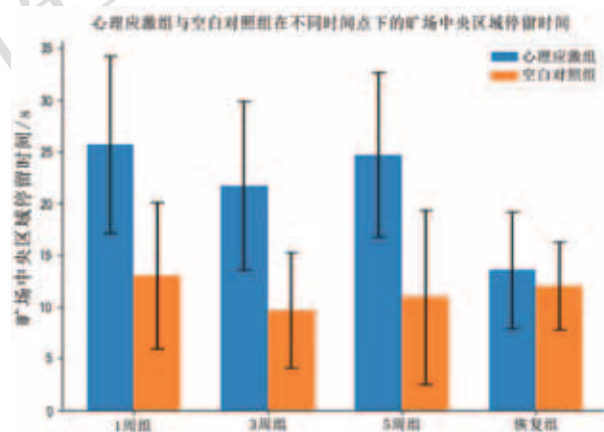


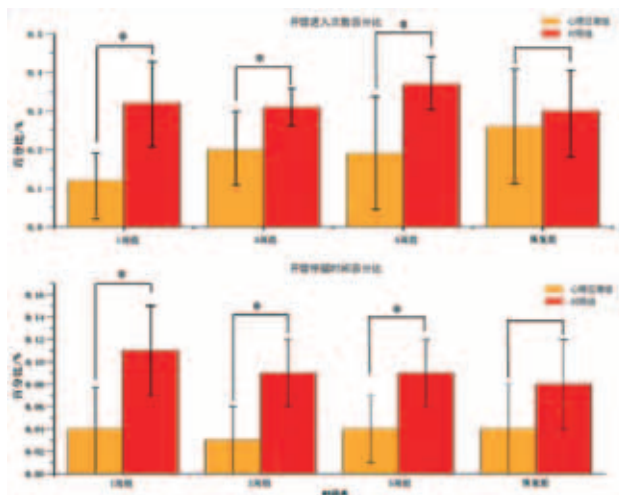
图2 旷场中央区域停留时间

2.4 高架实验结果

2.4.1 开臂进入次数百分比：心理应激1周组、3周组、5周组的大鼠开臂进入次数百分比与空白对照1周组、3周组、5周组相比明显减少，差异具有统计学意义（ $P<0.05$ ），心理应激恢复组与应激恢复对照组相比，差异无统计学意义（ $P>0.05$ ）。见图3。

2.4.2 开臂停留时间百分比：心理应激1周组、3周组、5周组的开臂停留时间百分比与空白对照1周组、3周组、5周组相比明显减少，差异具有统计学意义（ $P<0.05$ ），心理应激恢复组与应激恢复对照组相比，差异无统计学意义（ $P>0.05$ ）。见图3。

2.5 髌突组织学观察结果：镜下观察，对照组大鼠髌突软骨内细胞层次清楚，由表及里分别为纤维层、增殖层、过渡层、肥大层、钙化软骨层。软骨表面平滑整齐，纤维层呈粉色均质状，胶原纤维致密，连续性好，排列方向与软骨表面平行，纤维内散在分布少量梭形细胞，方向与纤维

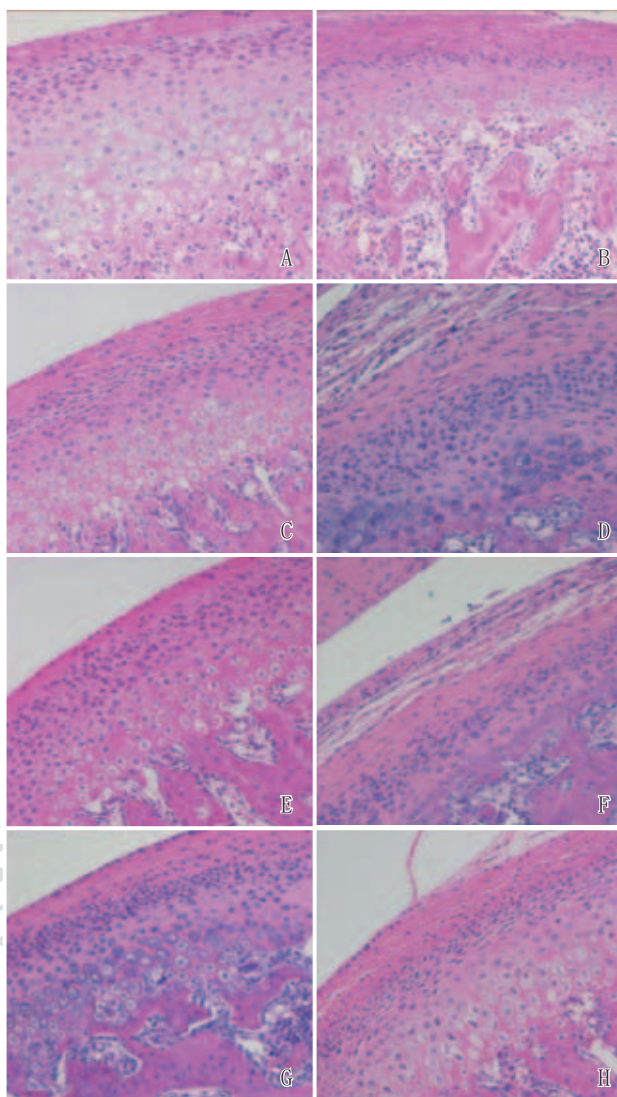


注：* $P < 0.05$
图3 大鼠开臂进入次数百分比与开臂停留时间百分比

走向一致；增殖层细胞数量较多，约8~10层，呈椭圆形，胞浆嗜碱性，核呈圆形或梭形，核仁清晰；过渡层细胞体积比增殖层略大，呈椭圆形，胞质淡染；肥大层细胞体积最大，呈圆形，部分染色极淡，核仁偏位，部分胞核固缩溶解，呈空泡状（见图4A、C、E、G）。心理应激1周组软骨胶原纤维排列紊乱（见图4B），3周组破坏最明显，软骨结构进一步损伤，表面纤维层断裂为大小不一的裂隙甚至脱离，软骨层变薄，增殖层细胞层数明显减少（见图4D），应激5周时情况略有好转，可见软骨表面纤维松解，出现裂隙，连续性遭到破坏，增殖层细胞较对照组稍有减少（见图4F），应激恢复组可见软骨表面纤维破坏情况得到较大改善，纤维间裂隙减少，增殖层细胞数目增加（见图4H）。

2.6 TUNEL染色结果：本实验采用TUNEL法检测软骨细胞的凋亡情况，阳性凋亡细胞核为绿色，对照组正常软骨细胞也存在凋亡现象，极少数软骨细胞的细胞核呈绿色（见图5）；心理应激1周组软骨细胞凋亡数目较对照组略增多，细胞凋亡率差异有统计学意义（ $P < 0.05$ ）；随着应激时间的增加，结果显示心理应激3周时软骨细胞凋亡数目最多，与对照组相比细胞凋亡率差异有统计学意义（ $P < 0.05$ ）；心理应激5周后软骨细胞凋亡数目与应激3周相比略有减少，但与对照组相比细胞凋亡率仍差异有统计学意义（ $P < 0.05$ ）。而心理应激恢复组比对照组细胞凋亡数目多，但细胞凋亡率差异无统计学意义（ $P > 0.05$ ）。见图6、表2。

表2 两组不同时间Tunel阳性细胞百分率比较 ($n=6, \bar{x} \pm s, \%$)				
组别	1周	3周	5周	应激恢复期
心理应激组	10.74±3.99	26.63±8.55	18.23±4.35	15.15±9.99
空白对照组	4.11±1.87	7.66±2.87	9.53±4.11	13.74±6.21
<i>t</i> 值	3.686	5.152	3.561	0.294
<i>P</i> 值	0.008	0.002	0.005	0.776



注：A. 空白对照1周组；B. 心理应激1周组；C. 空白对照3周组；D. 心理应激3周组；E. 空白对照5周组；F. 心理应激5周组；G. 应激恢复对照组；H. 应激恢复组

图4 大鼠髌突HE染色（200×）

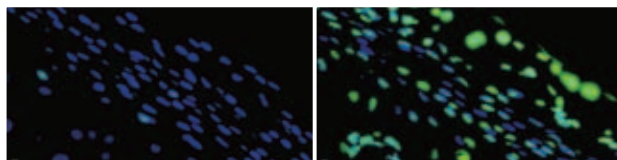
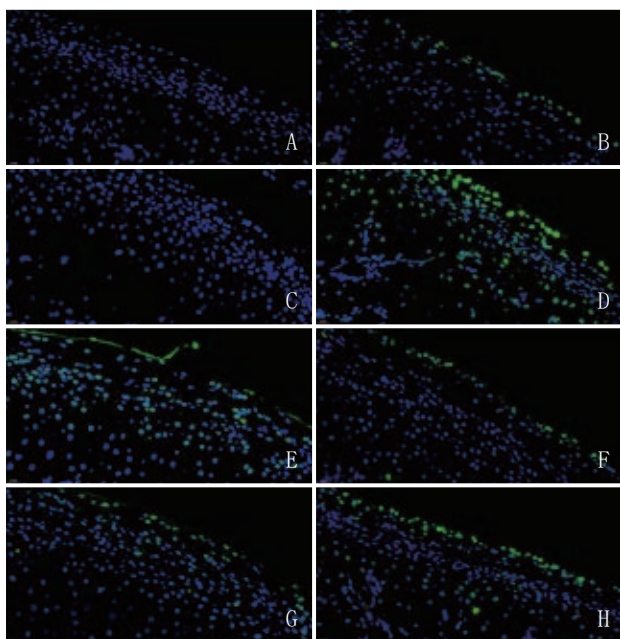


图5 心理应激1周组与3周组软骨细胞Tunel染色（100×）

2.7 Caspase-3免疫组化染色结果：结果显示，正常对照组软骨细胞仅有微弱的Caspase-3表达（见图7），心理应激1周组细胞Caspase-3阳性表达率升高，阳性率为（13.96±3.45）%，与同期对照组相比（4.57±2.30）%差异有统计学意义（ $P < 0.05$ ）。心理应激3周时细胞Caspase-3高表达，细胞内可见大量棕黄色颗粒[阳性率为（30.73±5.05）%]，与同期对照组（9.35±3.35）%相比具差异有统计学意义（ $P < 0.05$ ）。心理应激5周组细胞内Caspase-3阳性表达略低于应激3周组，阳性率为



注: A. 空白对照1周组; B. 应激1周组; C. 空白对照3周组; D. 应激3周组; E. 空白对照5周组; F. 应激5周组; G. 应激恢复对照组; H. 应激恢复组

图6 软骨细胞Tunel染色 (40×)

(25.92 ± 5.40)%, 与同期对照组 (10.60 ± 4.45)% 相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。心理应激恢复组可见细胞内Caspase-3阳性表达明显减少, 阳性率为 (22.67 ± 4.74)%, 与同期对照组 (12.16 ± 6.09)% 相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。这表明一定时间内细胞内Caspase-3的表达随应激时间的增加而增加, 在心理应激第3周时达到峰值, 随后随应激时间的增加, 细胞内Caspase-3表达开始减少。心理应激5周后自然恢复组细胞内Caspase-3表达较恢复前进一步减少。见图8、表3。

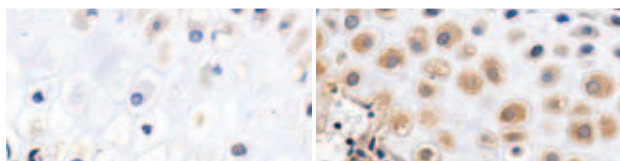


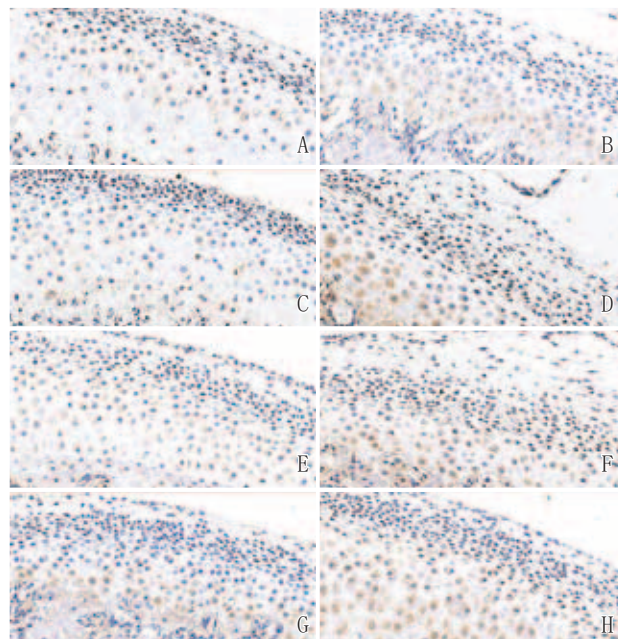
图7 心理应激1周与3周组Caspase-3免疫组化染色 (100×)

表3 两组不同时间Caspase-3阳性表达百分率比较 ($n=6$, $\bar{x} \pm s$, %)

组别	1周	3周	5周	应激恢复期
心理应激组	13.96 ± 3.45	30.73 ± 5.05	25.92 ± 5.40	22.67 ± 4.74
空白对照组	4.57 ± 2.30	9.35 ± 3.35	10.60 ± 4.45	12.16 ± 6.09
t值	5.547	8.642	5.363	3.336
P值	<0.001	<0.001	<0.001	0.008

3 讨论

单纯心理应激交流箱法可以有效避免动物躯体应激, 能够更准确地模仿人类情绪。由于电击的时间、强度可量



注: A. 空白对照1周组; B. 应激1周组; C. 空白对照3周组; D. 应激3周组; E. 空白对照5周组; F. 应激5周组; G. 应激恢复对照组; H. 应激恢复组

图8 Caspase-3免疫组化染色 (40×)

化, 这种方法有较好的可重复性, 但由于交流箱法应激方式比较单一, 随着应激时间增加动物可能会产生适应性和耐受性, 所以该方法不适用于建立长期心理应激模型。处在心理应激状态下的实验组大鼠体重增长量较同期对照组低, 个别应激组大鼠甚至出现了体重负增长现象, 这可能与心理应激使大鼠情绪紧张、抑郁焦虑继而导致的进食减少有关, 这一现象与人类患有抑郁症或焦虑症时短期内体重减轻现象^[20]相一致。应激组大鼠体重增长量虽减少, 但与同期对照组大鼠相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 这可能是由于大鼠体重增量为累积变量, 而本实验中所设计的组间时间间隔较短所致。

旷场试演和高架实验是公认有效评价动物应激模型的方法之一^[21]。与同期对照组相比, 心理应激1周组、3周组、5周组大鼠在中央区域停留时间更长, 总移动距离更短, 差异具有显著性 ($P < 0.05$), 这表明心理应激1、3、5周后动物自主探究行为减少, 精神紧张度增加, 抑郁程度较高, 处于应激状态; 心理应激恢复组与同期对照组大鼠的旷场中央区域停留时间、总移动距离相比, 结果差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 这说明去除刺激恢复四周后, 大鼠心理应激状态消失。

高架实验结果显示, 与同期对照组相比, 心理应激1周组、3周组、5周组大鼠进入开放臂次数少, 开放臂停留时间短, 结果均有统计学意义 ($P < 0.05$), 这表明动物恐惧心态增加, 探究行为减少, 焦虑程度较高。心理应激恢复组与同期对照组大鼠的开放臂进入次数、开放臂停留时间相比, 结果差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 说明去除刺激自行恢

复四周后,大鼠焦虑得到缓解,应激状态得到有效改善。因此,心理应激引起大鼠显著的行为学改变,表现为焦虑水平的显著增加,体重增长量略有减少但差异无统计学意义。

颞下颌关节髁突软骨是下颌骨重要的生长发育中心之一,作为软骨内唯一的细胞成分,软骨细胞的数目和功能至关重要。增殖层间充质细胞可增殖分化为成软骨细胞层内的成软骨细胞和软骨细胞,经过软骨内骨化形成钙化软骨,最终形成新骨。髁突软骨引导髁突乃至整个关节发生适应性改建。心理应激1周组,3周组,5周组髁突软骨均出现了不同程度的破坏。心理应激1周,由于时间较短,软骨表面胶原纤维仅出现轻微排列紊乱。应激时间增加至3周时,软骨结果破坏最明显,可见表面纤维层断裂甚至脱离,软骨层变薄,增殖层细胞层数也明显减少,随着应激时间进一步延长,应激5周时较3周时病变程度略减轻,表面纤维仍有松解,连续性破坏明显,增殖层细胞较对照组稍有减少。可见心理应激对颞下颌关节的影响是一个累积的过程,随着应激时间的延长,当刺激累积超过了机体自身的调节能力时,便会造成组织比较明显的病理性损伤,在应激开始后的前3周内随时间的延长而加重。然而当心理应激种类和强度保持不变时,随着应激时间的进一步延长,动物可能对该刺激产生了一定的适应性,虽从行为学来看此时动物仍处于应激状态,但软骨损伤不再进一步恶化。去除刺激源后应激恢复组髁突软骨病变显著减轻,这表明该损伤具有一定自愈性。由于心理应激对髁突软骨造成的损伤仅限于软骨中上层,并未出现严重的软骨下骨损伤,故其更容易修复,与文献报道一致^[22-24]。结论为心理应激导致大鼠颞下颌关节髁突软骨结构损伤,表现为软骨纤维层断裂、增殖层细胞层数减少等,且随着应激时间的延长,损伤加剧。

细胞凋亡是一种细胞程序性死亡。其中有Caspase级联反应参与的细胞凋亡是最凋亡的主要途径。本实验采用Tunel法评估软骨细胞凋亡情况,可以看到,在正常对照组中也存在细胞凋亡现象,但凋亡率极低,仅有个别细胞被绿色荧光标记。心理应激组在1周、3周和5周时的Caspase-3阳性表达百分率显著高于空白对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。这表明心理应激显著增加了Caspase-3的表达,提示应激可能诱导了细胞凋亡的增加,表明心理应激后软骨细胞的凋亡率明显提高。在一定时间内,软骨细胞凋亡率随心理应激时间延长而增加,在细胞应激3周时细胞凋亡率达到峰值,之后随着应激时间的延长5周组Caspase-3阳性率较3周组减小,这可能与机体对应激产生耐受性有关。在恢复阶段,心理应激组的Caspase-3阳性表达百分率有所下降,但仍高于空白对照组,说明尽管心理应激的影响在恢复期有所减弱,但其对细胞凋亡的影响仍然存在。Caspase-3的阳性表达率与软骨细胞凋亡率和髁突软骨破坏的严重程度呈正相关。软骨细胞凋亡率改变的趋势与髁突软骨组织学变化的趋势一致。凋亡的软骨细

胞大多分布在软骨的表层和中层,与文献报道一致。结论为心理应激组大鼠的软骨细胞凋亡率显著增加,尤其在应激3周时凋亡率最高,表明心理应激诱导了软骨细胞的过度凋亡。在心理应激停止后,自然恢复期大鼠的软骨组织结构 and 细胞凋亡情况有所改善,表明心理应激的部分损伤在停止应激后可以恢复。

综上所述,说明心理应激可以引起颞下颌关节髁突软骨的病理性改变,并且在软骨病理性进程中软骨细胞出现过度凋亡的现象。本研究表明单纯心理应激可引起颞下颌关节髁突软骨的病理性改变,可能与软骨细胞内Caspase-3表达增加及软骨细胞过度凋亡有关。这一发现为理解心理应激对颞下颌关节紊乱病(TMD)病理机制提供了重要理论依据,并提示在TMD的治疗和预防中应考虑心理因素的影响。

[参考文献]

- [1]张志愿.口腔颌面外科学[M].7版.北京:人民卫生出版社,2013:476.
- [2]Bruno R M, Duranti E, Ippolito C, et al. Different impact of essential hypertension on structural and functional age-related vascular changes[J]. Hypertension, 2017,69(1):71-78.
- [3]Barton M, Meyer M R, Prossnitz E R. Nox1 downregulators: A new class of therapeutics[J]. Steroids, 2019,152:108494.
- [4]Jung T W, Kim H C, Kim H U, et al. Asprosin attenuates insulin signaling pathway through PKC δ -activated ER stress and inflammation in skeletal muscle[J]. J Cell Physiol, 2019,234(11):20888-20899.
- [5]Karlsson L, Alpsten A, Mattsson J, et al. Influence of vasoactive drugs on the intratumor distribution of blood flow and vascular volume in a transplantable rat fibrosarcoma[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 1983,105(3):212-220.
- [6]Pu J, Bai D, Yang X, et al. Adrenaline promotes cell proliferation and increases chemoresistance in colon cancer HT29 cells through induction of miR-155[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012,428(2):210-215.
- [7]Rhee S H, Ma E L, Lee Y, et al. Corticotropin releasing hormone and urocortin 3 stimulate vascular endothelial growth factor expression through the cAMP/CREB pathway[J]. J Biol Chem, 2015,290(43):26194-26203.
- [8]Huang X, Liu H, Xiao P, et al. Effect of psychological stress on the structure of the temporomandibular joint and the expression of MMP-3 and TIMP-3 in the cartilage in rats[J]. Br J Oral Maxillofac Surg, 2014,52(8):709-714.
- [9]van der Kraan P M. Osteoarthritis year 2012 in review: biology[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2012,20(12):1447-1450.
- [10]Szczurek M, Mlak R, Szudy-Szczurek A, et al. Polymorphisms in the Gene Encoding Caspase 8 May Predict the Response to First-Line Platinum-Based Chemotherapy in Locally Advanced or Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer[J]. J Clin Med, 2021,10(5):1126.

- [11]弓娟琴.Fas介导的凋亡与caspase家族[J].国际皮肤性病杂志, 2001,27(5):279-281.
- [12]Shi Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis[J]. Mol Cell, 2002,9(3):459-470.
- [13]Porter A G, Jänicke R U. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis[J]. Cell Death Differ, 1999,6(2):99-104.
- [14]Odonkor C A, Achilefu S. Modulation of effector caspase cleavage determines response of breast and lung tumor cell lines to chemotherapy[J]. Cancer Invest, 2009,27(4):417-429.
- [15]李世清, 陈福敏, 罗君, 等. 顺铂对结肠癌细胞株Caco-2增殖凋亡和Bcl-2、Caspase3、Caspase9蛋白表达的影响[J].世界华人消化杂志, 2015,23(9):1460-1464.
- [16]Katayama S, Shimoda K, Takenaga Y. Loss of ADAR1 in human iPS cells promotes Caspase-3-mediated apoptotic cell death[J]. Genes Cells, 2015,20(8):675-680.
- [17]Joseph E K, Levine J D. Caspase signalling in neuropathic and inflammatory pain in the rat[J]. Eur J Neurosci, 2004,20(11):2896-2902.
- [18]Gomita Y, Yamori M, Furuno K, et al. Influences of psychological stress produced by intraspecies emotional communication on nicorandil plasma levels in rats[J]. Pharmacology, 1989,38(6):388-396.
- [19]贾克然, 郭刚, 刘开云, 等. 单纯心理应激小鼠模型的建立及对行为、内分泌免疫功能的影响[J].免疫学杂志, 2009,25(3):329-332.
- [20]Maniam J, Morris MJ. The link between stress and feeding behaviour[J]. Neuropharmacology, 2012, 63(1):97-110.
- [21]Katz R J, Roth K A, Carroll B J. Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression[J]. Neurosci Biobehav Rev, 1981,5(2):247-251.
- [22]Li Q, Huang F, Liu J, et al. Psychological stress alters extracellular matrix metabolism in mandibular condylar cartilage[J]. Chin J Dent Res, 2017,20(3):125-135.
- [23]Chen X, Cai C, Liu J, et al. Impact of estrogen-related receptor α on the biological characteristics of rat mandibular condylar chondrocytes[J]. Mol Med Rep, 2014, 10(1):195-202.
- [24]吴高义, 陈磊, 彭玲燕, 等. 心理应激对大鼠颞下颌关节盘和翼外肌微结构的影响[J].中华行为医学与脑科学杂志, 2011,20(9):3.

[收稿日期]2024-06-26

本文引用格式: 郑程东, 张媛媛, 张海娟, 等. 心理应激对SD大鼠颞下颌关节髁突软骨细胞凋亡及Caspase-3表达的影响[J].中国美容医学, 2025,34(3):7-13

•论 著•

芦荟大黄素抑制人黑素瘤细胞A375增殖和侵袭的作用及机制初探

李妍芯¹, 赵奥林¹, 阮英²

(1.咸宁市中心医院·湖北科技学院附属第一医院皮肤性病科 湖北 咸宁 437100; 2.湖北科技学院全科医学国家级实验教学示范中心 湖北 咸宁 437100)

[摘要]目的: 探讨芦荟大黄素经AKT/mTOR途径抑制人黑素瘤细胞(A375)增殖和侵袭的机制。方法: 设A375细胞组、紫杉醇组($500 \mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1}$)、芦荟大黄素低剂量组($500 \mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1}$)、高剂量组($1000 \mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1}$), 每组设6个平行样, 培养72 h。实验结束后, 采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法测定各组细胞增殖水平, 流式细胞术检测细胞凋亡率和细胞周期, Transwell法测定细胞侵袭水平, 划痕实验检测细胞迁移水平, RT-qPCR及Western blot法检测细胞AKT、P-AKT、mTOR mRNA和蛋白表达水平。结果: 与A375细胞组比较, 紫杉醇组、芦荟大黄素低、高剂量组OD值、存活率、穿膜数、迁移距离、AKT、P-AKT、mTOR mRNA和蛋白表达水平降低($P < 0.05$), 凋亡率、G2/M升高($P < 0.05$); 与紫杉醇组比较, 芦荟大黄素低剂量组OD值、存活率、穿膜数、迁移距离、AKT、P-AKT、mTOR mRNA和蛋白表达水平升高($P < 0.05$), 凋亡率、G2/M降低($P < 0.05$), 而芦荟大黄素高剂量组OD值、存活率、穿膜数、迁移距离、凋亡率、G2/M、AKT、P-AKT、mTOR mRNA和蛋白表达水平无明显变化($P > 0.05$); 与芦荟大黄素低剂量组比较, 芦荟大黄素高剂量组OD值、存活率、穿膜数、迁移距离、AKT、P-AKT、mTOR mRNA和蛋白表达水平降低($P < 0.05$), 凋亡率、G2/M降低($P < 0.05$)。结论: 芦荟大黄素对黑素瘤细胞增殖和侵袭具有明显抑制作用, 其机制可能与芦荟大黄素抑制AKT/mTOR通路的激活有关。

[关键词] 芦荟大黄素; AKT/mTOR途径; 人黑素瘤; 细胞增殖; 细胞侵袭

[中图分类号] R739.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1008-6455(2025)03-0013-05

基金项目: 湖北高校省级大学生创新创业训练项目(编号: S202110927030)

通信作者: 阮英, 硕士研究生、副主任医师; 研究方向为皮肤性病防治与皮肤美容。E-mail: 43705870@qq.com。

第一作者: 李妍芯, 主治医师; 研究方向为皮肤性病防治与皮肤美容。E-mail: Liyanxin19870728@163.com