

偏侧咀嚼对大鼠咬肌的影响及 IGF-1 调节机制探究

刘思琦 李颖辉 刘子洋 王雯* 马文盛*

河北医科大学口腔医院·口腔医院,正畸科,河北省重点实验室 河北 石家庄 050017

[摘要] **目的:**探究偏侧咀嚼对大鼠深层咬肌结构的影响以及胰岛素样生长因子-1(insulin like growth factor-1, IGF-1)在其中的作用。**方法:**4 周龄雄性 Wistar 大鼠 24 只随机分为实验组和对照组,实验组应用单侧戴用咬合板的方法建立偏侧咀嚼模型,建模后 1、2、3、4 周处死;取深层咬肌,通过冰冻切片苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色、三磷酸腺苷酶(adenosine triphosphatase, ATPase)染色、辅酶 I-四氮唑还原酶(nicotinamide adenine dinucleotide, NADH-TR)染色观察深层咬肌结构变化,实时定量聚合酶链反应(real-time quantitative polymerase chain reaction, Real-time PCR)检测 IGF-1 及钙调神经磷酸酶(calcineurin, CaN) mRNA 表达变化,酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)法检测 IGF-1 蛋白水平变化,Western blot 检测 CaN 蛋白水平变化。**结果:**与同期对照组比较,建模 2、3、4 周时非偏侧咀嚼侧 MHC II a 型肌纤维比例增多,并高于偏侧咀嚼侧($P<0.05$);且 IGF-1 和 CaN 的蛋白及 mRNA 水平在 3、4 周时高于偏侧咀嚼侧及对照组($P<0.05$)。**结论:**长期偏侧咀嚼促使非偏侧咀嚼侧咬肌纤维类型由 MHC II b 型向 MHC II a 型转换,这可能与 IGF-1 及 CaN 的分泌增多有关。

[关键词] 偏侧咀嚼 咬肌 胰岛素样生长因子-1 钙调神经磷酸酶

[文献标识码] A **[文章编号]** 1671—7651(2019)11—1094—06

[doi] 10.13701/j.cnki.kqxyj.2019.11.020

Effects of Unilateral Chewing on Structure of Deep Masseter Muscle in Rats and Regulation Mechanism of IGF-1. LIU Siqi, LI Yinghui, LIU Ziyang, WANG Wen*, MA Wensheng*. Department of Orthodontics, School and Hospital of Stomatology, Hebei Medical University & Hebei Key Laboratory of Stomatology, Shijiazhuang 050017, China.

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of unilateral chewing on the structure of deep masseter in rats and the role of IGF-1. **Methods:** Twenty-four male Wistar rats aged 4 weeks were randomly divided into experimental group and control group. A unilateral chewing model was established by unilateral occlusal plate. After 1, 2, 3, and 4 weeks of modeling, the deep masseter muscle was taken and the structural changes were observed by frozen section HE, ATPase, and NADH-TR staining. The expression of IGF-1 and CaN mRNA was detected by real-time RCR. The level of IGF-1 protein was detected by ELISA and the CaN protein was detected by Western blot. **Results:** After 2, 3, and 4 weeks of wearing occlusal plate, the proportion of MHC II a fibers on the non-biased chewing side increased more than that of the chewing side and was higher than that of the control group ($P<0.05$). The protein and mRNA content of IGF-1 and CaN on the non-biased chewing side were higher than that of the non-biased chewing side and control group at week 3 and 4 ($P<0.05$). **Conclusion:** Unilateral chewing leads to the transition of muscle fiber type from MHC II b to MHC II a, which may relate to the increased secretion of IGF-1 and CaN.

[Key words] unilateral chewing masseter insulin-like growth factor-1 calcineurin

基金项目 河北省高等学校科学技术研究青年基金项目(编号: QN2018145)
河北省重点研发计划项目健康医疗与生物医药专项(编号:18277756D)

作者简介 刘思琦(1994~),女,河北沧州人,硕士在读,主要从事口腔正畸临床治疗工作。

*** 通信作者** 王雯, E-mail: 82115@163.com

马文盛, E-mail: wsma02@sina.com

偏侧咀嚼是一种口腔不良习惯,长期偏侧咀嚼会对口腔颌面部软硬组织产生不良影响,造成其结构和功能紊乱,从而导致咬合异常、颞下颌关节紊乱^[1],甚至下颌偏斜的发生^[2]。咬肌作为咀嚼肌群中最主要的升颌肌,与咀嚼运动密切相关,在偏侧咀嚼发生后首先出现结构功能的变化^[3]。而胰岛素样

生长因子-1(insulin like growth factor-1, IGF-1)和钙调磷酸酶(calcineurin, CaN)作为调节肌肉的两种重要细胞因子,在咬肌的改变中也可能起着一定的作用。本研究拟通过单侧戴用咬合板的方法建立大鼠偏侧咀嚼的动物模型来研究偏侧咀嚼对深层咬肌结构的影响,并通过比较 IGF-1 及 CaN 在基因、蛋白水平的变化初步探究其机制。

1 材料与方法

1.1 主要器材及试剂 CM1900 冰冻切片机(德国 Leica 公司);PHS-3C pH 计(上海雷磁新泾仪器有限公司);Trizol(美国 Invitrogen 公司);逆转录及聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)试剂盒、酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(北京庄盟国际生物基因科技有限公司)。

1.2 实验动物及分组 无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级 4 周龄雄性 Wistar 大鼠 24 只,购自河北医科大学实验动物中心,动物合格证号:SCXK(冀)2013-1-003。检查所有大鼠咀嚼运动正常,无牙骀畸形。随机分为实验组和对照组,每组 12 只。

1.3 偏侧咀嚼模型建立 大鼠称重后 10%水合氯醛腹腔注射麻醉,麻醉剂量为 0.3 mL/100 g 体重。实验组使用 35%磷酸酸蚀左侧上颌磨牙牙面后堆塑树脂以升高咬合,第一磨牙区咬合板高度为 3 mm,第三磨牙区咬合板高度为 1.5 mm,左侧即为偏侧咀嚼侧,右侧为非偏侧咀嚼侧。对照组磨牙牙面酸蚀但不放置咬合板(图 1)。每日定时观察大鼠咀嚼运动和口内咬合板的存留情况。

1.4 标本的采集及处理 分别于建模后 1、2、3、4 周随机挑选各组大鼠 3 只,腹腔注射过量水合氯醛处死。处死后,于大鼠双侧咬肌深层提取肌肉组织作为标本,同时以大鼠比目鱼肌进行取材作为同缸染色的对照,异戊烷液氮速冻, -80℃冻存。

1.5 方法

1.5.1 冰冻切片染色 将肌肉标本放在切片机上进行连续切片,厚 10 μm,室温晾干后进行苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)、三磷酸腺苷酶(adenosine triphosphatase, ATPase)、辅酶 I-四氮唑还原酶(nicotinamide adenine dinucleotide, NADH-TR)染色。切片使用 Leica 显微分析系统于 20 倍物镜下拍照, NADH-TR 染色每张切片计数 150~200 条肌纤维,使用 Image-Pro Plus 软件计数咬肌各型肌纤维数目,并计算各型肌纤维百分比的变化。

1.5.2 ELISA 按 100 mg 肌肉标本加 900 μL 0.01 mol/L PBS 的比例进行组织匀浆处理,加入适量的蛋白酶抑制剂。根据 ELISA 试剂盒说明书进行咬肌 IGF-1 检测。



1a:实验组咬合板戴用前口外相;1b:箭头示左侧后牙咬合板;1c:咬合板戴用后 1 周实验组口外相;1d:咬合板戴用后 2 周实验组口外相;1e:咬合板戴用后 3 周实验组口外相;1f:咬合板戴用后 4 周实验组口外相

图 1 偏侧咀嚼模型建立

Fig. 1 Establishment of the unilateral chewing model.

1.5.3 Western blot 蛋白提取,二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)法蛋白定量,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜、封闭、CaN(1 : 300)一抗孵育,以 β-肌动蛋白(β-actin)为内参,利用 Image J 软件分析灰度值,计算 CaN 相对表达量。

1.5.4 实时定量聚合酶链反应(real-time quantitative polymerase chain reaction, Real-time PCR) 取 50 mg 肌肉标本 Trizol 法提取总 RNA,按反转录试剂盒说明书合成 cDNA。以上述合成的 cDNA 为模板,β-肌动蛋白(β-actin)为内参进行 Real-time PCR 扩增,引物序列见表 1。反应条件:热启动 50℃, 2 min;95℃, 10 min;变性 94℃, 15 s;退火 50℃, 20 s;延伸 72℃, 30 s;共 40 个循环。所得的荧光信号由 ABI 7500 v2.0.1 软件自动分析,采用比较阈值法测定靶基因的相对表达。

1.6 统计学方法 采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析,统计描述使用 $\bar{x} \pm s$ 表示;同期实验组双侧及对照组比较,方差齐者采用单因素方差分析,不齐则

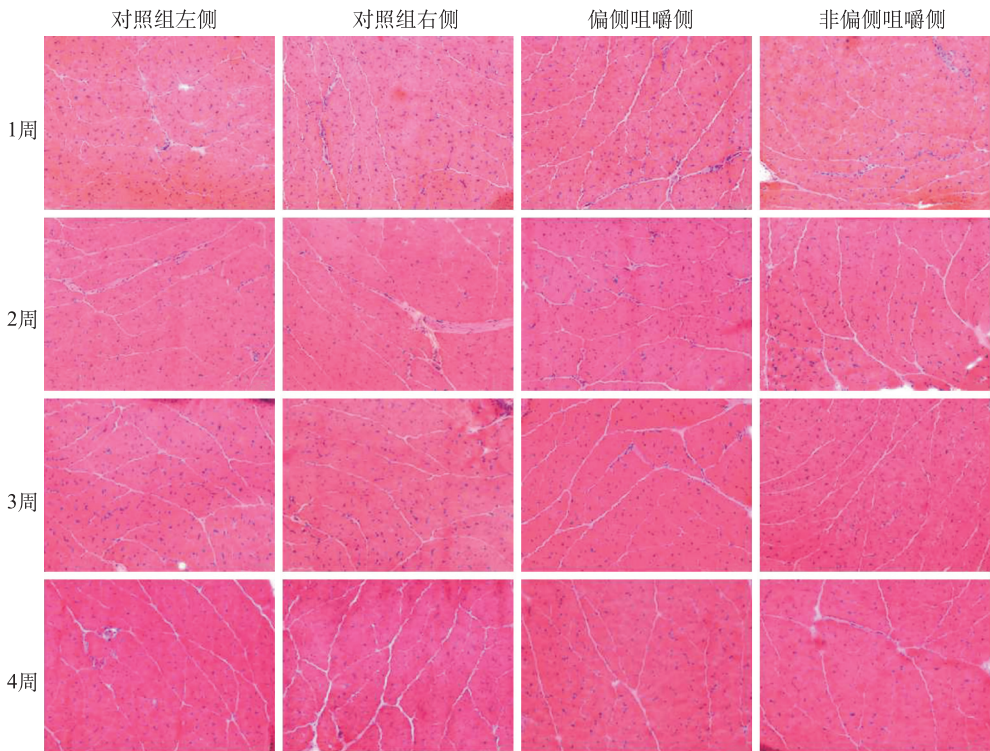


图 2 苏木精-伊红染色(×200)
Fig. 2 HE staining (×200).

表 1 实时定量 PCR 引物

Tab. 1 Primers used for real-time quantitative PCR		
目的基因	引物序列	
IGF-1	F:5'-ACGCTCTTCAGTTCGTGTGT-3'	
	R:5'-CTTCAGCGGAGCACAGTACA-3'	
CaN	F:5'-GATGGATTTGACGGAGCCAC-3'	
	R:5'-GTCAGGCCCTTCAGAGTTAGA-3'	
β -actin	F:5'-GTGGATCAGCAAGCAGGAGT-3'	
	R:5'-CGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3'	

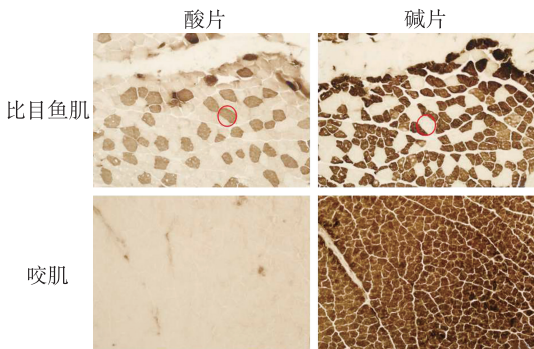


图 3 ATP 酶染色(×200)
Fig. 3 ATPase staining (×200).

采用 SNK 检验;各时间点实验组及对照组组间比较采用 SNK 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HE 染色 HE 染色结果示每周对照组及实

验组双侧肌纤维分界清晰,肌细胞横断面呈椭圆形,细胞质粉红,细胞核深染。且均无炎细胞生成,即咬合板的戴用未对组织造成损伤(图 2)。

2.2 ATP 酶染色 大鼠咬肌与比目鱼肌同缸染色,酸性条件下 MHC I 型纤维呈黑色,MHC II 型纤维呈白色;碱性条件下情况相反。结果显示比目鱼肌在酸性条件和碱性条件下均呈黑白相间的棋盘样分布。深层咬肌纤维酸性条件下孵育后呈白色,碱性条件下孵育后呈黑色,说明大鼠深层咬肌纤维仅有 MHC II 型纤维(图 3)。

2.3 NADH-TR 染色 NADH-TR 染色可进一步将 MHC II 型肌纤维分为深蓝紫色的 II a 型,浅蓝紫色的 II b 型以及介于两者之间的 II x 型(图 4)。建模 2 周实验组非偏侧咀嚼侧 II a 型肌纤维含量较对侧和同期对照组高($P<0.05$),且 1~4 周对照组双侧 II a 型肌纤维比例随时间变化呈现逐渐增高趋势($P<0.05$,图 5)。建模 3、4 周时实验组偏侧咀嚼侧 II x 型肌纤维含量较非偏侧咀嚼侧高($P<0.05$),在非偏侧咀嚼侧及对照组总体呈下降趋势,但差异无统计学意义。建模 4 周时实验组偏侧咀嚼侧 II b 型肌纤维含量较非偏侧咀嚼侧高($P<0.05$),且 1~4 周对照组双侧 II b 型肌纤维含量总体呈下降趋势($P<0.05$,表 2)。

2.4 IGF-1ELISA 结果 ELISA 结果显示,建模

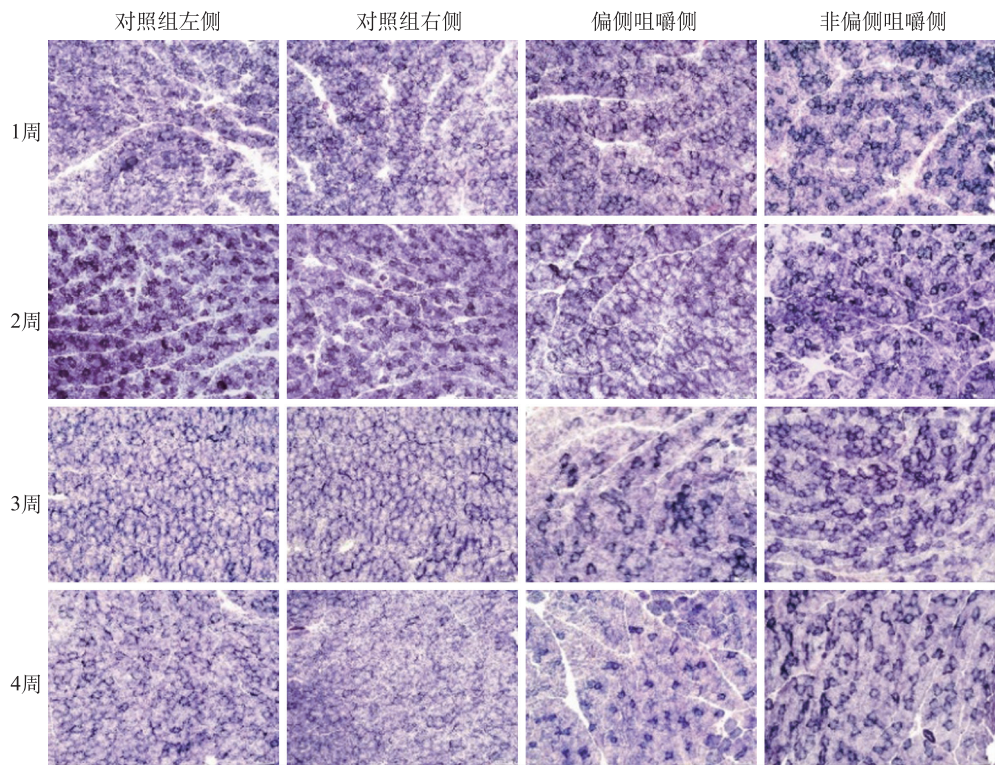


图 4 NADH-TR 染色(×200)
Fig. 4 NADH-TR staining (×200).

表 2 肌纤维构成变化
Tab. 2 Changes in the composition of muscle fiber $\bar{x} \pm s$

分组		MHC II a	MHC II x	MHC II b
1 周				
实验组	偏侧咀嚼侧	27.86±1.60	38.81±2.44	34.33±1.25
	非偏侧咀嚼侧	29.04±4.20	35.55±1.81	35.40±3.11
对照组	左侧	24.93±0.57	39.19±0.33	36.14±0.33
	右侧	23.30±0.71	41.65±0.73	35.05±0.57
2 周				
实验组	偏侧咀嚼侧	26.53±1.18	38.33±1.40	35.13±2.58
	非偏侧咀嚼侧	33.32±1.40 ^{ab}	31.29±3.81	35.38±5.22
对照组	左侧	26.17±0.44 ^c	38.93±0.64	34.90±1.07
	右侧	27.15±0.71 ^c	36.48±1.31	36.66±1.46 ^c
3 周				
实验组	偏侧咀嚼侧	25.28±0.05	40.56±1.81 ^a	33.96±1.61
	非偏侧咀嚼侧	40.04±0.11 ^{ab}	30.09±0.52	29.87±0.63
对照组	左侧	31.09±0.65 ^{cd}	37.41±2.93	31.50±3.54 ^{cd}
	右侧	29.82±0.60 ^{cd}	34.97±0.60	35.20±0.76 ^c
4 周				
实验组	偏侧咀嚼侧	21.90±1.76	41.35±1.22 ^a	36.75±2.08 ^{ab}
	非偏侧咀嚼侧	43.92±0.96 ^{ab}	30.00±0.58	26.08±0.58
对照组	左侧	37.24±0.39 ^{cde}	30.71±1.41	32.05±1.58 ^{cd}
	右侧	37.60±1.12 ^{cde}	30.89±2.15	31.74±2.90 ^{cde}

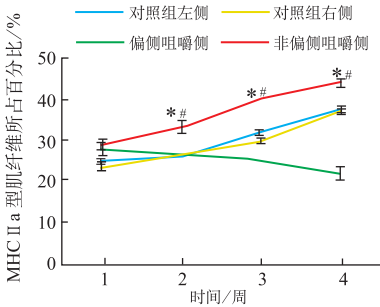
注:与同组对侧比较,a $P<0.05$;与同期对照组比较,b $P<0.05$;与同侧 1 周比较,c $P<0.05$;与同侧 2 周比较,d $P<0.05$;与同侧 4 周比较,e $P<0.05$

后 3 周及 4 周实验组非偏侧咀嚼侧 IGF-1 蛋白表达较偏侧咀嚼侧和对照组高($P<0.05$),见图 6。

2.5 CaN 蛋白表达 Western blot 结果显示,建模后 3 周及 4 周实验组非偏侧咀嚼侧 CaN 蛋白表达较偏侧咀嚼侧和对照组高($P<0.05$),见图 7、表 3。

2.6 IGF-1 及 CaN mRNA 表达 结果显示,建模后 3 周和 4 周时,实验组非偏侧咀嚼侧 IGF-1 及 CaN mRNA 相对表达均较偏侧咀嚼侧和对照组高($P<0.05$),见图 8。

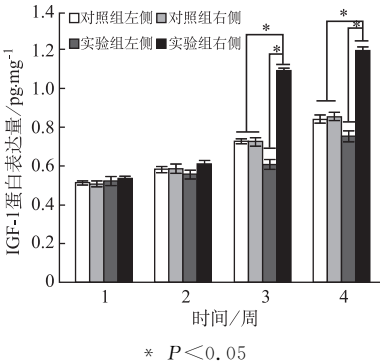
3 讨论



与同组对侧比较, * $P<0.05$; 与同期对照组比较, # $P<0.05$

图 5 MHC II a 肌纤维构成变化

Fig. 5 Changes in the composition of MHC II a fiber.



* $P<0.05$

图 6 ELISA 检测咬肌内 IGF-1 蛋白表达量

Fig. 6 Detection of IGF-1 protein expression in masseter by ELISA.

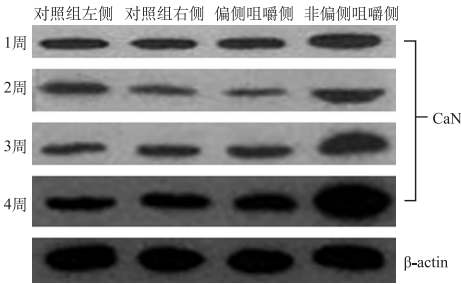


图 7 各组 CaN 蛋白表达

Fig. 7 Expression of CaN protein in each group.

表 3 Western blot 检测咬肌内 CaN 蛋白表达

Tab. 3 Detection of CaN protein in masseter by western blotting

分组	$\bar{x} \pm s$			
	1 周	2 周	3 周	4 周
对照组左侧	0.42±0.03	0.45±0.02	0.46±0.03	0.48±0.03
对照组右侧	0.43±0.02	0.44±0.01	0.46±0.02	0.49±0.02
偏侧咀嚼侧	0.44±0.01	0.44±0.03	0.45±0.01	0.48±0.01
非偏侧咀嚼侧	0.45±0.03	0.47±0.01	0.73±0.03*	0.88±0.03*

注: 与同组对侧和同期对照组比较比较, * $P<0.05$

有学者观察大鼠咀嚼运动发现正常大鼠运动轨迹图基本左右对称, 且运动频率几乎相同, 证明采用大鼠建立偏侧咀嚼模型是可行的^[4]。偏侧咀嚼动物

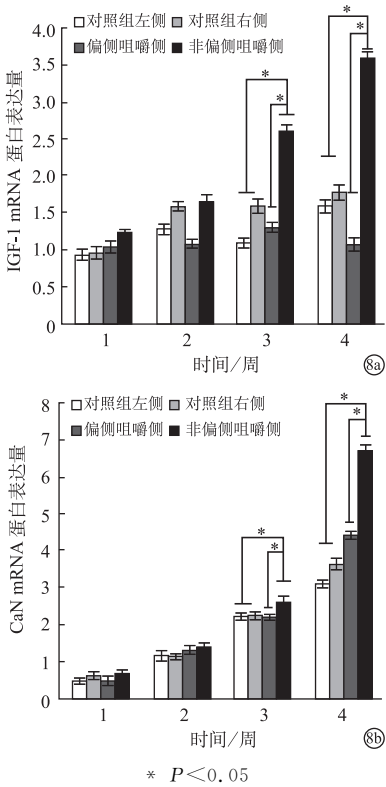


图 8 各组 IGF-1 (8a)、CaN(8b) mRNA 相对表达结果

Fig. 8 Expression of mRNA of IGF-1 (8a) and CaN(8b) in each group.

模型建立的常用方法有磨牙法和拔牙法, 磨牙法易损伤软组织造成感染, 拔牙法属于有创操作可能对组织造成损伤。本实验采取了咬合板加高单侧后牙咬合的方法来建立偏侧咀嚼模型。行为学观察发现大鼠戴用咬合板后即偏向咬合板侧咀嚼, 且静止时下颌位置偏向咬合板侧并逐渐加重, 证明该动物模型成功建立。

3.1 偏侧咀嚼导致肌纤维表型的变化 咀嚼运动是口颌系统最重要的功能和生理颌运动之一, 偏侧咀嚼习惯的产生会导致咬合紊乱, 进而对口颌系统产生影响。其中肌肉作为口颌系统行使功能的动力来源, 它的活动与咀嚼运动密切相关^[5], 较其他部位首先出现改建^[3]。

本研究发现大鼠深层咬肌仅含有 MHC II 型肌纤维, 并根据 NADH-TR 染色深浅分为不同的亚型。NADH-TR 为线粒体脱氢酶, 所以染色越深, 表明肌纤维线粒体脱氢酶越多, 有氧代谢能力越强。有研究表明受到特定刺激时肌纤维各亚型之间可以相互转化^[6]。本研究建模 2 周即发现实验组双侧咬肌肌纤维类型的构成发生明显变化, 这说明偏侧咀嚼早期就发生了肌纤维类型的转换, 以调节肌肉的有氧代谢能力适应咬合的变化。建模 2~4 周, 实验

组非偏侧咀嚼侧Ⅱa型肌纤维比例明显高于偏侧咀嚼侧以及对照组,且逐渐升高,Ⅱb型肌纤维逐渐减少,这与石安迪等^[7]的研究结果一致。表明长期偏侧咀嚼导致非偏侧咀嚼侧肌肉氧化代谢能力明显增强,并且双侧的结构差异呈不断加重的趋势。Hylander等^[8]发现非偏侧咀嚼侧压力大于偏侧咀嚼侧。我们观察到静止状态下大鼠的偏斜程度随着建模时间的增加而加重,使双侧肌肉处于不对称的拉伸状态。这种咀嚼压力的不对称以及位置改变造成的肌肉不对称拉伸可能是双侧肌肉变化不同的原因。随大鼠鼠龄增长,对照组Ⅱa型比例逐渐上升,Ⅱx与Ⅱb型肌纤维总体呈下降趋势,这可能时大鼠的咀嚼运动逐渐成熟,耐力也逐渐增强。

3.2 IGF-1、CaN与肌纤维表型的关系 骨骼肌纤维的转化受到多种细胞因子的调控,其中IGF-1是骨骼肌生长的重要调节者,对骨骼肌的生长分化具有重要的生物学作用^[9]。运动或机械拉伸能促进骨骼肌IGF-1的分泌^[10],并直接作用于自身肌肉。3~4周时大鼠下颌位置基本固定偏向工作侧,这种下颌位置的改变导致非偏侧咀嚼侧的肌肉处于一种拉伸的状态,同时偏侧咀嚼运动导致非偏侧咀嚼侧压力增加。拉伸以及压力的变化使肌肉负荷增加,导致非偏侧咀嚼侧IGF-1分泌增多高于偏侧咀嚼侧及对照组。IGF-1对调节钙离子通道有调节作用^[11],IGF-1分泌增多可以激活钙离子通道,导致骨骼肌中钙离子浓度增加。同时,咀嚼运动变化刺激小α运动神经元释放的神经冲动也可以诱导钙离子通道的开放。钙离子浓度升高可以激活CaN及其下游信号通路^[12]。这与本研究中3~4周时非偏侧咀嚼侧CaN分泌增多且高于对侧及对照组的结果是一致的。

CaN在MHCⅠ型、MHCⅡ型肌纤维中均有表达,其中Ⅰ型与Ⅱa型倾向于有氧代谢,属于慢肌纤维,Ⅱd/x与Ⅱb型倾向于糖酵解属于快肌纤维^[12]。多项研究表明,CaN对于选择性激活慢肌纤维基因表达,促使MHCⅡ型向MHCⅠ型转化起重要作用^[13,14]。而肌纤维的转化通常遵循特定的顺序,即从MHCⅡb型到Ⅰ型(Ⅱb→Ⅱx→Ⅱa→Ⅰ)的过渡^[6],从而改变其表型。所以我们可以推测,深层咬肌中CaN分泌随IGF-1浓度升高而增加后可以促使肌纤维表型由Ⅱb型向Ⅱa型转化,增强肌肉的有氧代谢及抗疲劳能力。

综上所述,偏侧咀嚼可以引起双侧咬肌纤维结构的变化,这可能是IGF-1和CaN分泌改变导致

的。提示临床中应早期纠正偏侧咀嚼的习惯防止咬肌发生器质性病变,并为临床治疗偏侧咀嚼引起的肌功能紊乱提供了新的治疗方向。

参考文献

- [1] Yu Q, Liu Y, Chen X, et al. Prevalence and associated factors for temporomandibular disorders in Chinese civilianpilots [J]. *Int Arch Occup Environ Health*, 2015, 88(7):905-911.
- [2] Reinhardt R, Tremel T, Wehrbein H. The unilateral chewing phenomenon, occlusion, and TMD [J]. *Cranio*, 2006, 24(3): 166-170.
- [3] Douglas CRAvoglio JL, De OH. Stomatognathic adaptive motor syndrome is the correct diagnosis for temporomandibular disorders [J]. *Medical Hypotheses*, 2010, 74(4): 710-718.
- [4] 李波, 李晓箐, 易新竹. 偏侧咀嚼习惯对口颌系统的影响—物模型建立[J]. *实用口腔医学杂志*, 2006, 22(2):152.
- [5] Higashi K. A clinical study on the relationship between chewing movements and masticatory muscle activities [J]. *Osa-ka Daigaku shigaku zasshi*, 1989, 34(1):26-63.
- [6] Zhang M, Gould M. Segmental distribution of myosin heavy chain isoforms within single muscle fibers [J]. *Anat Rec*, 2017, 300(9):1636-1642.
- [7] 石安迪, 曾林, 刘静. 偏侧咀嚼致大鼠咬肌肌纤维代谢特征改变及其腺苷酸活化蛋白激酶调节机制[J]. *华西口腔医学杂志*, 2017, 35(3):258-263.
- [8] Hylander WL, Johnson KR, Crompton AW. Loading patterns and jaw movements during mastication in *Macaca fascicularis*: Abone-strain, electromyographic, and cineradiographic analysis [J]. *Am J Phys Anthropol*, 1987, 72(3): 287-314.
- [9] 曾永芬, 黄义德. 胰岛素样生长因子1及其在组织和器官生长发育中的作用[J]. *生命科学研究*, 2015, 19(2):165-168.
- [10] Player DJ, Martin NR, Passey SL, et al. Acute mechanical overload increases IGF-I and MMP-9 mRNA in 3D tissue-engineered skeletal muscle [J]. *Biotechnol Lett*, 2014, 36(7): 1555-1556.
- [11] Ceylan-Isik AF, Li Q, Ren J. Insulin-like growth factor I (IGF-1) deficiency ameliorates sex difference in cardiac contractile function and intracellular Ca^{2+} homeostasis [J]. *Toxicol Lett*, 2011, 206(2):130-138.
- [12] 贺杰, 漆正堂, 丁树哲. 骨骼肌重塑中的钙调神经磷酸酶信号转导通路[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(2):343-346.
- [13] Mu X, Brown LD, Liu Y, et al. Roles of the calcineurin and CaMK signaling pathways in fast-to-slow fiber type transformation of cultured adult mouse skeletal muscle fibers [J]. *Physiol Genomics*, 2007, 30(3):300-312.
- [14] Miyazaki M, Hitomi Y, Kizaki T, et al. Calcineurin-mediated slow-type fiber expression and growth in reloading condition [J]. *Med Sci Sports Exerc*, 2006, 38(6):1065-1072.

[收稿日期:2018-12-07]

(本文编辑 关隽)