

网络出版时间: 2022-06-27 17:19 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20220624.1735.004.html>

SGK-1 通过软骨破坏和炎性疼痛传导参与 颞下颌关节骨关节炎

程慧欣¹, 白苗苗¹, 沈振国¹, 季华锋², 张政², 邢田¹, 王元银^{1,3}

摘要 目的 探究血清和糖皮质激素诱导的蛋白激酶 1 (SGK-1) 在大鼠颞下颌关节 (TMJ) 骨关节炎 (TMJ-OA) 中的作用。方法 16 只大鼠随机分为对照 (Control) 组和 TMJ-OA 组, TMJ-OA 组关节腔内注射碘乙酸钠 (MIA), Control 组注射等量 0.9% 氯化钠溶液; von-Frey 测量头部退缩阈值 (HWT) 评估疼痛行为; 苏木精伊红 (HE)、番红固绿染色观察 TMJ 组织学结构变化; qRT-PCR 检测大鼠髁突软骨 (MCC) 中 SGK-1、基质金属蛋白酶 13 (MMP-13)、白介素 (IL)-1 β 、环氧合酶 (COX-2) mRNA 表达。HE 染色观察三叉神经节 (TG) 组织病理变化以及检测 TG 中 SGK-1、COX-2 mRNA 的表达。结果 MIA 关节腔内注射 28 d 可引起大鼠头部退缩阈值 (HWT) 降低, MCC 及软骨下骨结构紊乱, TG 神经纤维空泡样变。qRT-PCR 检查显示, 与 Control 组相比, TMJ-OA 组大鼠 MCC 和 TG 组织中 SGK-1 表达升高 ($P < 0.05$)。结论 SGK-1 可能通过关节局部软骨破坏和炎性疼痛传导两种途径参与 TMJ-OA 的病理过程。

关键词 血清和糖皮质激素诱导的蛋白激酶 1; 颞下颌关节骨关节炎; 三叉神经节

中图分类号 R 782.6

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)07-1029-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.07.004

颞下颌关节骨关节炎 (temporomandibular joint osteoarthritis, TMJ-OA) 是一种以下颌髁突软骨 (mandibular condylar cartilage, MCC) 退变为特征的进行性退行性关节疾病^[1], 患者主要表现为关节疼痛、下颌运动异常及功能障碍。目前对于 TMJ-OA 的临床治疗方案多以对症治疗为主, 尚无有效的预

防和根治措施。血清和糖皮质激素诱导的蛋白激酶 1 (serum-and glucocorticoid-induced kinase 1, SGK-1) 作为丝/苏氨酸蛋白激酶家族成员之一, 参与离子通道调节、细胞增殖分化、自噬抑制等多种临床生理和病理过程^[2]。近年来有研究^[3-5]表明, SGK-1 在膝骨关节炎 (knee osteoarthritis, KOA) 及外周神经系统的痛觉传导中发挥作用, 但 SGK-1 在 TMJ-OA 中的作用尚无研究报道。本研究旨在探究 SGK-1 是否参与调控 TMJ-OA 软骨破坏及以痛觉传导进程, 以期临床预防和治疗 TMJ-OA 提供新靶点。

1 材料与方法

1.1 实验动物 6 周龄雄性 SPF 级 SD 大鼠 16 只, 体质量 (200 $\pm$ 20) g, 购于安徽医科大学实验动物中心, 保持室温 (22 $\pm$ 2) $^{\circ}\text{C}$, 湿度 (50 $\pm$ 10) %, 自由进食水, 每 12 h 变换昼夜节律, 实验开始前适应性喂养 7 d, 本实验采用的实验方法均符合实验室动物伦理准则 (动物伦理批号: LLSC20190123)。

1.2 实验材料 碘乙酸钠 (monosodium iodoacetate, MIA) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 逆转录试剂盒 (日本 Takara 公司); qRT-PCR 引物 (上海生工生物工程股份有限公司); 扩增试剂盒 (中国南京诺唯赞公司); 超微量紫外分光光度计 (美国 Thermo Fisher 公司); 实时荧光定量 PCR 仪 (瑞士 Roche 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验性大鼠 TMJ-OA 模型建立 将 16 只 6 周龄雄性 SPF 级 SD 大鼠随机分为两组, 即 TMJ-OA 组和 Control 组。按 3 ml/kg 腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉, 双侧 TMJ 区域消毒, 以大鼠外耳道和眼角连线上, 距外耳道约 3 mm 处, 相当于颧弓下方作为进针点, 向上向前向内, 抵骨壁后后退后退约 1 mm, 回抽无血后, 双侧关节腔分别注射 50 μl MIA (10 mg/ml), 留针 1 min, Control 组双侧关节腔按同样的方法, 注射等量 0.9% 氯化钠溶液, 见图 1。造模后 28 d, 过量麻醉处死大鼠, 分别取各组大鼠左侧完整 TMJ 及三叉神经节 (trigeminal ganglion, TG) 用于 HE 染色和番红固绿染色, 取右侧 MCC 及 TG 用于 qRT-PCR。

2022-05-12 接收

基金项目: 安徽省重点研究和开发计划项目 (编号: 201904a07020062); 国家自然科学基金 (青年科学基金项目) (编号: 82000552)

作者单位: ¹ 安徽医科大学口腔医学院, 合肥 230032

² 病原生物学安徽省重点实验室, 合肥 230032

³ 安徽省口腔疾病研究中心实验室, 合肥 230032

作者简介: 程慧欣, 女, 硕士研究生;

邢田, 女, 副教授, 博士, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: xingtian8110@163.com;

王元银, 男, 教授, 博士, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: wangyuanxin@ahmu.edu.cn

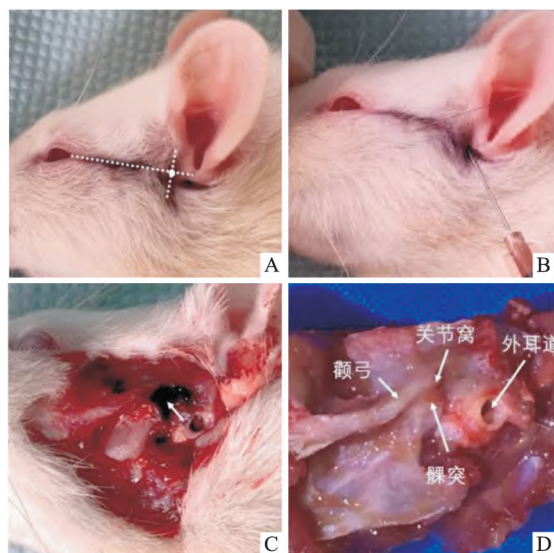


图1 TMJ-OA 动物模型构建

A: 注射位点; B: 注射角度; C: 准确注射墨水使关节腔着色; D: 大鼠 TMJ 解剖示意图

1.3.2 行为学检测 采用 von-Frey 毛刷测定大鼠头退缩阈值(head withdrawal threshold, HWT), 分别在造模前 3 d 测定大鼠基础阈值, 筛选过于迟钝或敏感的大鼠, 并在造模后 1、7、14、21、28 d 测定大鼠 HWT 值变化; 检测 HWT 前, 将大鼠分别置于不同小笼中适应 30 min, 待大鼠安静后, 用 von-Frey 毛刷按照从小到大的力度刺激 TMJ 区域, 每个力度重复刺激 10 次, 以出现至少 6 次头退缩, 或抓挠 TMJ 区域视为阳性, 记录最小阳性值作为 HWT 值。

1.3.3 HE 染色 将取出的完整左侧 TMJ 在 4% 多聚甲醛中固定 24 h 后, 10% EDTA 脱钙 30 d, 至探针可以轻松穿过组织, 然后常规脱水、浸蜡、包埋、切片、HE 染色; 左侧 TG 多聚甲醛中固定 24 h 后, 直接脱水、浸蜡、包埋、切片, HE 染色, 在显微镜下观察组织病理变化。

1.3.4 番红固绿染色 将左侧 TMJ 石蜡切片脱蜡, 脱水, 经固绿、番红染液染色后快速脱水, 封片, 显微镜下观察。

1.3.5 qRT-PCR 检测 mRNA 表达水平 将右侧 MCC 和 TG 分别在液氮中研磨至粉末状, 转移至无酶 EP 管, TRIzol 法提取 RNA, DEPC 水溶解, 测定总 RNA 浓度、纯度, 定量后, 逆转录成 cDNA, SYBR 法扩增, 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算, β -actin 校准。引物序列详见表 1。

1.4 统计学处理 采用 GraphPad Prism 7.0 软件对实验结果进行统计分析, 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组之间的数据通过独立 t 检验进行分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表1 各基因 qRT-PCR 引物序列一览表

目的基因	引物序列(5'-3')
SGK-1	F: ATGGGACAACGTCCACCTTC R: TGTGTTCCGGCTGTAGAACGC
IL-1 β	F: CTCACAGCAGCATCTCGACAAGAG R: TCCACGGGCAAGACATAGGTAGC
COX-2	F: CTCAGCCATGCAGCAAATCC R: GGGTGGGCTTCAGCAGTAAT
MMP-13	F: ACCATCCTGTGACTCTTGCG R: TTCACCCACATCAGGCACTC
β -actin	F: AGATCAAGATCATTCCTCTCCT R: ACGCAGCTCAGTAACAGTCC

2 结果

2.1 行为学检测结果 Control 组和 TMJ-OA 组大鼠体质量变化无明显差异($t = 4.76, P > 0.05$) (图 2); Control 组大鼠 HWT 值未见明显变化, TMJ-OA 组 HWT 值低于 Control 组 [Control 组(21.53 ± 0.72) g, TMJ-OA 组(12.29 ± 3.46) g], 差异有统计学意义($t = 2.61, P < 0.05$), 且 1 d 后即出现 HWT 降低($t = 4.29, P < 0.001$), 约在 7 d 左右达到阈值最低点($t = 5.64, P < 0.0001$), 此后 HWT 值出现缓慢上升, 但是 28 d 左右阈值仍然明显低于 Control 组($t = 3.17, P < 0.05$), 表明 TMJ-OA 组大鼠出现机械痛觉过敏, 见图 3。

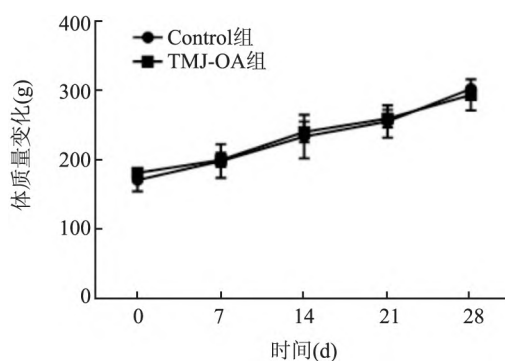


图2 大鼠体质量变化

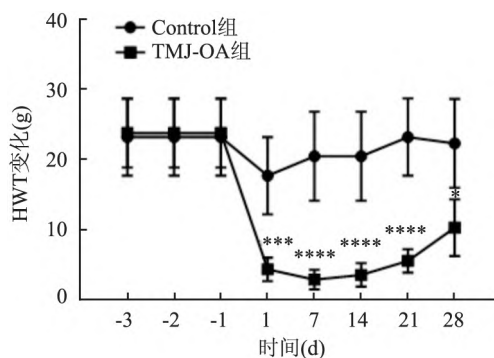


图3 大鼠 HWT 变化

与 Control 组比较: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

2.2 组织病理学结果

2.2.1 TMJ 组织病理学变化 取出大鼠 MCC 后肉眼可见 Control 组大鼠 MCC 表面光滑透亮, TMJ-OA 组 MCC 表面缺损,粗糙失去光泽(图4)。HE 染色结果显示(图5A、B),Control 组大鼠 MCC 由层次分明的四层组成:纤维层、增殖层、肥大层、钙化软骨层。注射 MIA 28 d 后, TMJ-OA 组大鼠出现典型的骨关节炎样病变: MCC 表面部分缺损,软骨纤维化,纤维层部分细胞核丢失(黑色箭头),肥大层变薄甚至消失(绿色箭头),细胞层次紊乱、界限不清(黄色箭头),出现无细胞区(红色箭头),软骨细胞簇形成(白色箭头)。番红固绿染色结果显示(图4C、D),Control 组大鼠 MCC 肥大细胞层基质均匀红染; TMJ-OA 组软骨基质淡染,甚至部分区域红染消失(黑色箭头),表明软骨受到损伤,软骨细胞释放过量蛋白多糖,使软骨基质分布不均。

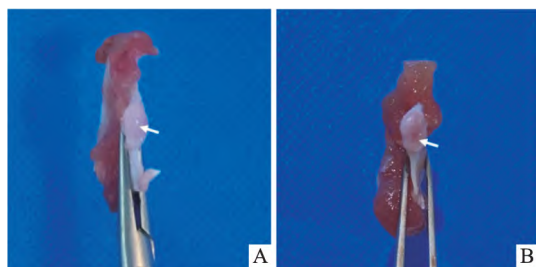


图4 大鼠髁突大体观

A: Control 组; B: TMJ-OA 组

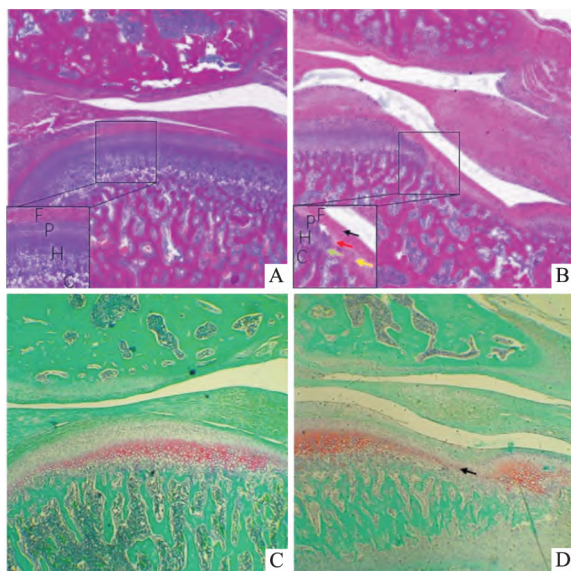


图5 TMJ 组织病理学变化 $\times 40$

A: Control 组 HE 染色; B: TMJ-OA 组 HE 染色; C: Control 组番红固绿染色; D: TMJ-OA 组番红固绿染色; F: 纤维层; P: 增殖层; H: 肥大层; C: 钙化软骨层

2.2.2 TG 组织病理学变化 Control 组大鼠 TG 神经纤维排列整齐紧密,施万细胞分布均匀。注射 MIA 28 d 后, TMJ-OA 组神经纤维排列紊乱松散(黄色箭头),出现空泡样变,即脱髓鞘改变(红色箭头),施万细胞增多(绿色箭头)等(图6)。

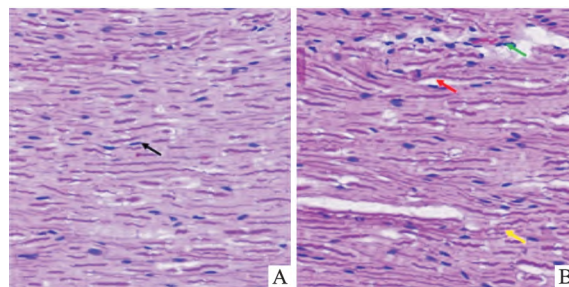


图6 TG 组织病理学变化 HE 染色 $\times 400$

A: Control 组; B: TMJ-OA 组

2.3 大鼠 MCC 中 mRNA 表达 qRT-PCR 检测大鼠 MCC 中 SGK-1、IL-1 β 、环氧合酶(cyclooxygenase, COX)-2、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMP)-13 mRNA 的表达,结果显示:与 Control 组相比, TMJ-OA 组 SGK-1 ($t = 2.21, P < 0.05$)、IL-1 β ($t = 2.81, P < 0.05$)、COX-2 ($t = 3.11, P < 0.05$)、MMP-13 ($t = 3.21, P < 0.01$) 的 mRNA 表达量均有不同程度的上调,差异有统计学意义(图7)。

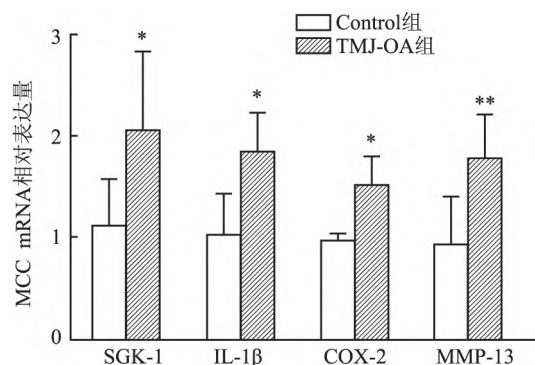


图7 大鼠 MCC 中 mRNA 表达

与 Control 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.4 大鼠 TG 中 mRNA 表达 qRT-PCR 检测 TG 中 SGK-1、COX-2 mRNA 的表达,结果显示:与 Control 组相比, TMJ-OA 组 SGK-1 ($t = 4.76, P < 0.01$)、COX-2 ($t = 2.76, P < 0.05$) mRNA 的表达量均有不同程度的上调,差异有统计学意义(图8)。

3 讨论

TMJ-OA 特征是细胞应激和细胞外基质降解,

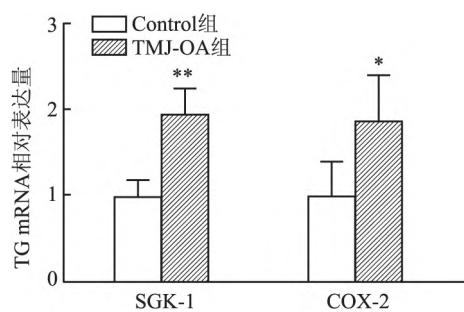


图8 大鼠 TG mRNA 表达

与 Control 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表现为局部炎症及软骨损伤。本研究参照 Wang et al^[7] 的方法通过关节腔内局部注射 MIA 构建大鼠 TMJ-OA 模型,大体观及组织病理学结果显示 MIA 注射可引起 OA 特征性改变,与临床 TMJ-OA 患者具有相似的组织病理变化^[1,3]。本研究发现 IL-1 β 及 COX-2 在 MCC 中高表达,提示 MIA 可以引起 MCC 炎症反应及氧化应激损伤,这与临床患者和其他动物模型疾病进程相一致^[9-10]。软骨细胞主要功能是合成胶原蛋白等对细胞外基质进行补充, MMP 通过分解 II 型胶原维持 TMJ 的生理结构的平衡;在本研究中, TMJ-OA 组软骨基质淡染,同时 MCC 中 MMP-13 mRNA 高表达,推测可能是在炎症微环境下,软骨细胞损伤,产生细胞因子可能刺激 MMPs 等的合成,加重软骨基质降解,从而加剧了 OA 的发展。

TMJ 关节区疼痛是 TMJ-OA 患者最亟待解决的问题, TG 作为头面部外周痛觉信号枢纽接收 TMJ 软骨下骨及滑膜组织中游离神经末梢传导的神经冲动,并将它们上传至中枢神经系统,产生疼痛。本研究中 TMJ-OA 组大鼠 HWT 显著降低,且 TG 神经纤维出现显著脱髓鞘改变,形成慢性疼痛损伤。有研究指出,氧化应激可能直接损害神经元功能或导致胶质细胞过度激活,这可能有助于神经退行性疾病中的慢性持续性炎症及神经元功能障碍^[11],在高糖诱导的背根神经节神经元细胞损伤模型中,抑制 COX-2 的表达可减轻神经元细胞的损伤和氧化应激水平^[12],而在 TMJ-OA 模型中 TG 内 COX-2 的表达鲜有报道,本研究结果显示 COX-2 在 TMJ-OA 组 TG 内表达显著上调。尽管 MCC 中无神经分布,但发生 TMJ-OA 时,持续的炎症状态、关节内炎症因子诱导 TG 神经元细胞损伤及神经递质的变化也可能对疼痛的放大和迁延具有促进作用。

SGK-1 是 Webster et al^[13] 在对糖皮质激素诱导

的大鼠乳腺癌细胞进行基因表达的差异筛选时发现的一个丝/苏氨酸蛋白激酶。近年来研究报道 SGK-1 与 KOA 的软骨破坏相关,研究发现,临床患者和小鼠 KOA 模型中,损伤的软骨细胞高表达 SGK-1,敲低软骨细胞 SGK-1 基因表达后,受到炎症刺激的软骨细胞增殖明显,且胶原合成增加^[4-5]。尽管同为关节软骨, TMJ 软骨与膝关节软骨具有不同的组织结构: TMJ 是纤维软骨,由 I、II 型胶原蛋白组成^[14]。本研究发现与 Control 组相比, TMJ-OA 组 MCC 中 SGK-1 的 mRNA 表达水平上调。除了参与炎症免疫性疾病的病理过程, SGK-1 还与学习记忆、神经元兴奋、中枢神经系统性疾病相关;研究发现, SGK-1 可以通过促进背根神经节中 Nav1.7 上调从而诱导慢性手术后疼痛,抑制 SGK-1 减轻周围伤害感受器中 Nav1.7 的失调可能是防止慢性手术后疼痛向中枢神经痛发展的有效途径^[6]。但目前 SGK-1 在 TG 中是否表达尚无文献报道,本研究发现 TMJ-OA 组 TG 中 SGK-1 的表达水平上调。以上实验结果提示, SGK-1 通过关节局部软骨破坏和炎症疼痛传导两种途径参与 TMJ-OA 的病理过程。

综上所述, MIA 关节内注射可以得到与 TMJ-OA 患者相似的病理表现和疼痛症状, SGK-1 在破坏的 MCC 中和损伤的 TG 中均表达上调,将 SGK-1 作为治疗靶点,抑制患者异常表达的 SGK-1,可能具有抗炎和缓解疼痛的双相效应。但 SGK-1 参与 TMJ-OA 进程的分子机制及涉及的信号通路调控途径尚不清楚,还需进一步在动物实验和细胞水平深入研究。

参考文献

- Alzahrani A, Yadav S, Gandhi V, et al. Incidental findings of temporomandibular joint osteoarthritis and its variability based on age and sex [J]. *Imaging Sci Dent*, 2020, 50(3): 245-53.
- Lang F, Stourmaras C, Zacharopoulou N, et al. Serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 and the response to cell stress [J]. *Cell Stress*, 2018, 3(1): 1-8.
- Wang D, Zhang Z, Si Z, et al. Dapagliflozin reverses the imbalance of T helper 17 and T regulatory cells by inhibiting SGK1 in a mouse model of diabetic kidney disease [J]. *FEBS Open Bio*, 2021, 11(5): 1395-405.
- Huang W, Cheng C, Shan W S, et al. Knockdown of SGK1 alleviates the IL-1 β -induced chondrocyte anabolic and catabolic imbalance by activating FoxO1-mediated autophagy in human chondrocytes [J]. *FEBS J*, 2020, 287(1): 94-107.
- Wang Z, Ni S, Zhang H, et al. Silencing SGK1 alleviates osteoarthritis through epigenetic regulation of CREB1 and ABCA1 expres-

- sion [1]. *Life Sci*, 2021, 268: 118733.
- [6] Liu B W, Zhang J, Hong Y S, et al. NGF-Induced Nav1.7 Up-regulation Contributes to Chronic Post-surgical Pain by Activating SGK1-Dependent Nedd4-2 Phosphorylation [J]. *Mol Neurobiol*, 2021, 58(3): 964–82.
- [7] Wang X D, Kou X X, He D Q, et al. Progression of cartilage degradation, bone resorption and pain in rat temporomandibular joint osteoarthritis induced by injection of iodoacetate [J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e45036.
- [8] Wang X D, Zhang J N, Gan Y H, et al. Current understanding of pathogenesis and treatment of TMJ osteoarthritis [J]. *J Dent Res*, 2015, 94(5): 666–73.
- [9] Huang Z, Yang R, Zhang L, et al. BRD4 inhibition alleviates mechanical stress-induced TMJ OA-like pathological changes and attenuates TREM1-mediated inflammatory response [J]. *Clin Epigenetics*, 2021, 13(1): 10.
- [10] Seki H, Fukuda M, Iino M, et al. Immunohistochemical localization of cyclooxygenase-1 and -2 in synovial tissues from patients with internal derangement or osteoarthritis of the temporomandibular joint [J]. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2004, 33(7): 687–92.
- [11] Lin C H, Tao P L, Tsay H J, et al. Dextromethorphan Dampens Neonatal Astrocyte Activation and Endoplasmic Reticulum Stress Induced by Prenatal Exposure to Buprenorphine [J]. *Behav Neurol*, 2021, 2021: 6301458.
- [12] Cheng X, Zhao L, Ke T, et al. Celecoxib ameliorates diabetic neuropathy by decreasing apoptosis and oxidative stress in dorsal root ganglion neurons via the miR-155/COX-2 axis [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 22(2): 825.
- [13] Webster M K, Goya L, Ge Y, et al. Characterization of sgk, a novel member of the serine/threonine protein kinase gene family which is transcriptionally induced by glucocorticoids and serum [J]. *Mol Cell Biol*, 1993, 13(4): 2031–40.
- [14] Bielajew B J, Donahue R P, Espinosa M G, et al. Knee orthopedics as a template for the temporomandibular joint [J]. *Cell Rep Med*, 2021, 2(5): 100241.

The involvement of SGK-1 in cartilage destruction and inflammatory pain in temporomandibular joint osteoarthritis

Cheng Huixin¹, Bai Miaomiao¹, Shen Zhenguo¹, Ji Huafeng², Zhang Zheng², Xing Tian¹, Wang Yuanyin^{1,3}

(¹Stomatological College of Anhui Medical University, Hefei 230032; ²The Key Laboratory of

Microbiology and Parasitology of Anhui Province, Hefei 230032; ³Key Lab of Oral

Diseases Research of Anhui Province, Hefei 230032)

Abstract *Objective* This study aimed to explore the role of SGK-1 in the occurrence of temporomandibular joint (TMJ) osteoarthritis (TMJ-OA). *Methods* Sixteen rats were randomly divided into Control group (Control group) and TMJ-OA group (TMJ-OA group), and TMJ-OA group was injected with sodium iodoacetate (MIA) intra articular cavity while Control group was injected with 0.9% sodium chloride solution. Pain behavior was assessed by measuring the head withdrawal threshold (HWT) with a von-Frey apparatus. Hematoxylin-eosin (HE) and Safranin O-fast green stains were used to observe the histological structure changes of the condyle of TMJ-OA rats. Real-time PCR was performed to exam the expression levels of mRNA of SGK-1, MMP-13, IL-1 β , COX-2 in mandibular condylar cartilage (MCC). HE stain was used to observe the histological structure changes of the trigeminal ganglion (TG) of TMJ-OA rats. Real-time PCR was performed to exam the expression levels of mRNA of SGK-1, COX-2 in TG. *Results* MIA injection induced typical OA-like lesions in the TMJ within 28 days. Administration of MIA led to the significant decrease in HWT, disordered of the condyle cartilage and subchondral bone structure, demyelination aggravated of nerve fibers in TMJ rats. Compared with rats in Control groups, the expression levels of SGK-1 in MCC and TG of rats in TMJ-OA group were upregulated. *Conclusion* In the pathological process of TMJ-OA, SGK-1 may plays an important role not only in cartilage structural damage but also in pain transmission.

Key words serum-and glucocorticoid-induced kinase 1; temporomandibular joint osteoarthritis; trigeminal ganglion