

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.10.010

慢性睡眠剥夺对颞下颌关节微结构的影响*

吕晓伟^{1,2} 吴高义¹ 何玉宏¹ 王培欢¹ 朱国雄^{1△}

(1 济南军区总医院口腔科 山东 济南 250031; 2 辽宁医学院 辽宁 锦州 121000)

摘要 目的:研究慢性睡眠障碍对大鼠颞下颌关节微结构的影响。**方法:**采用改良多平台法(MMPM)建立睡眠剥夺模型,将 90 只 Wistar 大鼠随机分为 3 组(n=30),分别为小平台组、网格组和对照组。小平台组和网格组大鼠接受每天 18 h 的睡眠剥夺和 6 h 间歇期(10:00—16:00),间歇期大鼠正常笼养。实验第 7、14 和 21 天时分别行动物行为学观察、旷场试验和动物血浆检测,并通过 HE 染色和扫描电镜观察颞下颌关节微结构的变化。**结果:**与对照组和网格组相比,小平台组大鼠血清促肾上腺皮质激素(ACTH)和皮质醇(CORT)水平均增高(P<0.05),髁突软骨 HE 染色显示软骨细胞层次及厚度改变;扫描电镜结果显示关节盘表面纤维排列松散。**结论:**慢性睡眠障碍可能导致颞下颌关节微结构发生病理性改变。

关键词:睡眠障碍;颞下颌关节;髁突软骨;关节盘;微结构

中图分类号:Q95-3;R782.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2015)10-1840-04

Effects of Chronic Sleep Deprivation on the Ultrastructure of Temporomandibular Joint*

LV Xiao-wei^{1,2}, WU Gao-yi¹, HE Yu-hong¹, WANG Pei-huan¹, ZHU Guo-xiong^{1△}

(1 Jinan General Military Hospital, Jinan, Shandong, 250031, China; 2 Liaoning Medical college, Jinzhou, Liaoning, 121000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of chronic sleep deprivation (Wistar) on the ultrastructure of temporomandibular joint (TMJ). **Methods:** The Sleep deprivation (SD) was conducted according to modified multiple platform method (MMPM). The platforms were the support points for the animals when the tank filled with water, and rats which were placed on narrow platforms would fall into the water and wake up when their muscle relaxed (fall into sleep) during sleep deprived period; while rats that stayed on wide platforms were allowed to lie down without falling into water and could sleep anytime. Food and water were available to the animals at all times during the experiment. 90 Wistar rats were divided into three groups (N=30), narrow platform group, grid group and control group. The sleep deprivation protocol was accomplished by sleep depriving with rats for 18 h every day for 3 weeks, and the rats were allowed to sleep for 6 h (from 10:00 to 16:00) in cages. The stress level of animals was estimated by the change of behavior, elevated plus-maze (EPM) and hormonal assays, while the histomorphology and microstructure of rat condyles were observed by hematoxylineosin (HE) staining and scanning electron microscopy (SEM) at the 1, 2, and 3 week during the experiment, respectively. **Results:** Both plasma adrenocorticotrophic hormone (ACTH), corticosterone (CORT) were higher in the narrow platform group than that of grid group and control group (P<0.05). HE staining and histomorphometric data analysis showed decreased thicknesses of the central and posterior condylar cartilages in stressed rats at the 3 weeks in the narrow platform group. However, the collagen fibers fissures could be observed on the disc of TMJ under the scanning electron microscope. **Conclusion:** Sleep deprivation could lead to pathologic changes of the condyles of stressed rats, suggesting a potential link between sleep disturbance and the pathogenesis or progression of TMD.

Key words: Sleep disturbance; Temporomandibular joint; Condylar cartilage; Articular disc; Ultrastructure.

Chinese Library Classification (CLC): Q95-3; R782.6 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)10-1840-04

前言

颞下颌关节紊乱病(TMD)是伴有疼痛、关节弹响、肌肉压迫及下颌运动受限的一种常见疾病,可导致一定程度的形态和/或功能变化^[1,2]。其病因目前尚存争议^[3],心理因素作为引起TMD的主要因素之一,近年来已得到越来越多的关注。流行病

学和病原学研究报道,来自家庭、工作、学校及其他现代社会挑战的心理压力是TMD发生发展的重要危险因素^[4]。此外,有文献报道心理应激可能会导致TMD^[3,5,6]。

睡眠障碍是一种机体适应外界环境或刺激的心理应激表现形式。焦虑、抑郁等心理应激可不同程度的影响睡眠质量^[7,8]。睡眠障碍与心理应激是相互作用的,睡眠障碍也可对情绪、认

* 基金项目:第 48 批中国博士后科学基金项目(2010048152);第 4 批中国博士后特别资助基金(201104771);

山东省中青年科学家奖励基金(2011BSBO2001);济南军区总医院院长基金项目(2010M08)

作者简介:吕晓伟(1987-),女,研究生,主要研究方向:睡眠剥夺对口腔颌面系统的影响,电话:15066109109, E-mail:yueyueji1228@163.com

△ 通讯作者:朱国雄, E-mail:jnjqzgx@163.com

(收稿日期:2014-11-06 接受日期:2014-11-25)

知能力产生消极影响,可导致烦躁、抑郁等异常心理活动,阻碍生理平衡的维持和机体的恢复过程^[6]。另外,睡眠障碍可作为脑部、躯体多个系统和器官病变的应激原,影响脑^[9]、心血管^[10]及自主神经、免疫^[11,12]等多个组织系统的正常功能,导致体液中多种炎症因子水平上升^[13,14]。我们的前期研究表明睡眠障碍可使 TMJ^[15]、咬肌炎性因子水平增高^[16],咀嚼肌结构及肌电活动改变^[17,18]。那么,睡眠障碍能否引起大鼠髁突软骨和软骨下骨组织微结构发生变化,进而出现病理变化?本研究将通过对睡眠剥夺状态下大鼠下颌髁突微结构的观察,为睡眠障碍与 TMD 的关系提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂

实验用 90 只成年雄性 Wistar 大鼠(8 周龄,体重 180-200 g,购于山东大学实验动物中心),饲养于济南军区总医院实验动物中心。睡眠剥夺水箱:济南军区总医院动物实验中心提供;矿场箱:济南军区总医院动物实验中心提供;扫描电镜:日立 S-4800 扫描电镜(SEM,日本日立公司,日本)ACTH 放免试剂盒:(北京北方生物技术研究所,北京);CORT 放免试剂盒:(北京科美东雅生物技术有限公司,北京)。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 动物处理 将 90 只 Wistar 大鼠随机分为 3 组(n=30),分别为小平台组、网格组和对照组。小平台组和网格组大鼠接受每天 18 h 的睡眠剥夺和 6 h 间歇期(10:00—16:00),间歇期大鼠正常笼养。所有实验大鼠购进后笼养 1 周,以适应新的饲养环境;此外,实验前小平台组和网格组大鼠在水箱中每天适应 30 min,持续 1 周,以消除实验动物对水环境的恐惧。适应期及实验期间所有动物可自由活动,取食饮水,各组大鼠常规喂养普通饲料和水。实验第 1、2 和 3 w 时分别行动物行为学观察、旷场试验和动物血浆检测,并通过 HE 染色和扫描电镜观察颞下颌关节微结构的变化。

1.2.2 模型建立 采用 MPMM 方法建立睡眠剥夺模型。制作 110 cm×70 cm×40 cm 的玻璃水箱,水箱内设置 15 个直径为 6.3 cm、高度为 8 cm 的圆柱形小平台,平台间相隔 15 cm。水箱注满水后,水位位于平台下 1 cm,保持水温室温 18-22℃。大鼠能够在平台间自由活动、饮水和取食。当大鼠进入深度睡眠状态时,由于肌张力减低就会落入水中,从而造成睡眠障碍。大平台为在小平台上固定网格底面,其他条件同小平台。对照组正常笼养。实验组大鼠睡眠剥夺期间保持正常的昼夜光照。每天更换水箱中的水。网格组和小平台组大鼠每天 16:00 至次日 10:00 在水箱中接受睡眠剥夺,当日 10:00—16:00 正常笼养,每天睡眠剥夺 18 h。对照组大鼠正常笼养,不做任何处理。

1.2.3 研究方法 (1)CORT 测定:将校准品(或样品)、标记物和抗体按操作程序依次加入试管中,使标记抗原和抗原与限量抗体发生竞争性结合,待反应平衡后,加入分离剂,离心沉淀,使游离抗原与抗原抗体复合物分离,测量沉淀中放射性强度。ACTH 测定:将已获取的血浆样品与一定的 125I-ACTH 及限量的 ACTH 抗血清混匀于 4℃ 温水浴中过夜,加入免疫分离剂 3500 r/min 离心 15 min,吸去上清液,测定沉淀部分的放射强度。(2)旷场试验方法:将每只大鼠单独置于旷场中央,实验

者 2 人同时观察,分别记录大鼠 5 min 内的动作行为表现。分为水平活动得分和垂直活动得分:动物穿越 1 格得 1 分;双足离开底面直至放下双足为 1 分。清洁矿场箱后进行下一只老鼠的检测,避免上一只老鼠留下的气味影响下一只老鼠行为而影响实验结果。(3)标本制取:实验第 1、2、3 w 时分别对 3 组大鼠进行取材。10%水合氯醛 0.35 mL/100 g 腹腔注射麻醉,心脏取血,静置 2 h 后 1500 r/min 分离血清,保存至 -20℃ 冰箱中。取血后大鼠脱颈处死,分离颞下颌关节。将各组大鼠的左侧颞下颌关节固定于 10%多聚甲醛缓冲液中,10%乙二胺四乙酸钠(EDTA)脱钙液(0.1 M 磷酸缓冲液, pH 7.0)脱钙一个月、脱水一周后包埋、切片、HE 染色。各组大鼠的右侧关节于 2.5%戊二醛 4℃ 固定 24 h,0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液冲洗,经酒精梯(30%→50%→70%→80%→90%→95%)脱水、临界点干燥,真空喷金后扫描电镜观察髁突表面及关节盘内外表面纤维的变化。

1.3 统计学分析

统计学分析中,各组数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS13.0 统计软件处理并采用 t 检验, P<0.05 时为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 HE 染色结果

正常的颞下颌关节髁突软骨分为四层,由表及里依次为纤维层、增殖层、成熟层及肥大型。髁突软骨表面光滑连续,软骨下髁突骨小梁排列整齐、均匀、无纤维化病变;关节盘及滑膜组织具有适当的厚度、形态规则,无水肿、炎性细胞及渗出物。实验第 1 w 时,网格组、小平台组及对照组大鼠之间,髁突软骨细胞层次结构没有明显变化,软骨厚度没有显著的统计学差异;第 2 w 时,可见小平台组大鼠关节下腔间隙增宽,髁突软骨后部纤维层分离、剥脱;3 w 时,小平台组大鼠髁突软骨表面表现为局部粗糙,软骨细胞层区域性变薄,松质骨骨细胞消失,并出现骨陷窝。关节下腔间隙进一步增宽,可观察到脱落的滑膜细胞或炎性渗出物。此外,软骨纤维层剥离或脱落。网格组及对照组大鼠 2 w 和 3 w 时 TMJ 结构没有明显变化(图 1)。

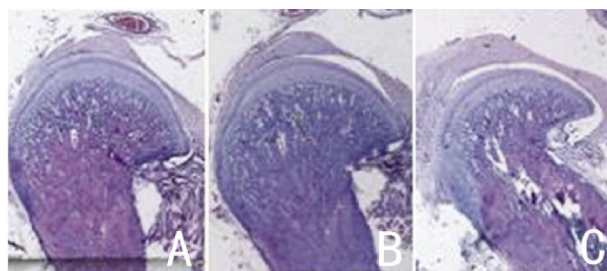


图 1 颞下颌关节髁突软骨的 HE 染色结果(× 200)

Fig. 1 HE staining of condylar cartilages of temporomandibular joint at 3 weeks(× 200)

注:A:对照组;B:网格组;C:小平台组

Note: A: control group; B: grid group; C: narrow platform group

2.2 扫描电镜结果

对照组及网格组大鼠髁突表面光滑连续,相对平整;关节盘内表面波纹连续均匀,胶原纤维排列方向一致、相互平行。小平台组大鼠 1 w 时关节盘内表面发生一定程度的病理性改变。

2 w 组大鼠的关节盘后带可见轻微的胶原纤维断裂,关节腔中可见脱落的滑膜细胞,髁突表面胶原纤维水肿、松解;3 w 组大鼠关节盘后带出现纤维玻璃样变、断裂,严重区形成裂隙。髁突

的软骨变薄,表面带胶原纤维间水肿、松解更为严重,形成大小不一的纵裂和横裂,部分区域可见表面软骨细胞层脱落(图 2)。

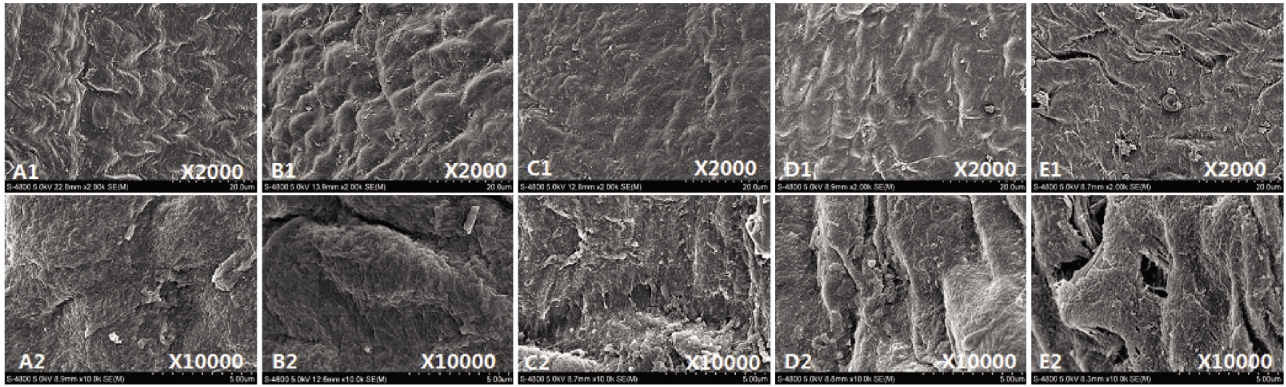


图 2 颞下颌关节髁突软骨表面扫描电镜结果($\times 2000, \times 10000$)

Fig. 2 EPM of condylar cartilages of temporomandibular joint

注:A:对照组 3 周;B:网格组 3 周;C:小平台组 1 周;D:小平台组 2 周;E:小平台组 3 周。

Note: A: control group at 3w; B: grid group at 3w; C: narrow platform group at 1w; D: narrow platform group at 2w; E: narrow platform group at 3w.

2.3 大鼠行为学变化

小平台组大鼠第 1 w 时兴奋性增加,出现烦躁、激怒现象,组内个体之间打斗撕咬;毛发粗糙、蓬乱无光泽;进食差、体重增长缓慢,差别有统计学意义($t=5.969, P<0.01$)。2 w 天时体重($t=3.066, P<0.05$)及毛发有所改善,3 w 时小平台组大鼠行为学、体重和毛发与网格组和对照组大鼠无明显差异($P>0.05$)。

2.4 旷场试验结果

网格组和对照组大鼠各时期水平活动得分和垂直活动得

分组间比较无统计学差异($P>0.05$);小平台组大鼠第 1 w 时水平活动得分和垂直活动得分均高于网格组和对照组,有统计学意义($P<0.05$)、2 w 和 3 w 时大鼠水平活动得分和垂直活动得分与网格组和对照组大鼠没有明显差异($P>0.05$)。

2.5 血浆 ACTH 和 CORT 水平

小平台组大鼠各时期的血浆 ACTH 和 CORT 水平均高于网格组和对照组。网格组和对照组大鼠各时期 ACTH 和 CORT 水平没有统计学意义($P>0.05$)。

表 1 第 3 w 时各组大鼠体重、旷场试验评分及血浆 ACTH 和 CORT 水平情况($\bar{x} \pm s$)

Table 1 The change of Body weight, EPM score and hormone levels of rats in serum at 3w($\bar{x} \pm s$)

	Body weight	EPM score		Plasma hormone levels	
		Closed-arm	Open-arm	ACTH(pg/mL)	CORT(ng/mL)
NAP	235.4 $\pm$ 5.6*#	33.61 $\pm$ 5.70*#	77.66 $\pm$ 10.33*#	207.14 $\pm$ 23.96*#	9.71 $\pm$ 0.73*#
GPI	263.6 $\pm$ 6.6	22.51 $\pm$ 3.24	52.12 $\pm$ 10.70	135.16 $\pm$ 16.44	5.61 $\pm$ 0.65
CON	269.2 $\pm$ 7.5	21.39 $\pm$ 3.38	51.43 $\pm$ 9.67	133.40 $\pm$ 13.90	5.46 $\pm$ 0.81

注:NAP:小平台组;GPI:网格组;CON:对照组。* $P<0.05$,与对照组比较;# $P<0.05$,与网格组比较。

Note: NAP: narrow platform group; GPI: grid group; CON: control group. * $P<0.05$, compared with control group; # $P<0.05$, compared with grid group.

3 讨论

TMJ 随着机体生长发育,其结构形态可不断改建,从而引起 TMJ 的功能性变化。正常状态下 TMJ 的改建有利于咀嚼、语言等功能的发挥。但是,强烈刺激或长期慢性刺激作用下,关节结构从功能适应性改建状态发展为病理性形态改变,最终导致伴有临床症状的 TMD。研究表明,睡眠障碍可能与 TMD 或其他组织器官病变有关^[10-15,19,20]。而睡眠障碍对 TMD 的发生发展的影响可能比焦虑等其他心理应激作用更显著,持久^[21]。本研究运用 MMPM 模型观察了睡眠障碍对大鼠的行为、血浆相关激素水平及颞下颌关节微结构的影响,进一步证实了睡眠障碍对 TMD 的影响,本次实验采用大鼠 MMPM 模型,允许大鼠在平台之间自由活动、跳跃,以及保持大鼠群居生活方式,避免

了大鼠因活动受限和独居而影响实验结果。同时,网格设计除了面积与小平台不同,其他试验条件均与小平台相同,可排除水环境对大鼠情绪的影响。大鼠睡眠剥夺期间,并非完全睡眠缺失,当大鼠进入深度睡眠状态时,由于肌张力减低落入水中,异相睡眠和深慢波睡眠受到抑制或丧失,在每天的睡眠窗期又得到部分补偿^[22]。所以 MMPM 更好的模拟了人类睡眠障碍模式。不同的应激状态和环境能够激活 HPA 轴的调节反馈功能。在受到紧张、睡眠不足等刺激后,下丘脑室旁核神经元细胞分泌促肾上腺皮质激素释放激素促进垂体分泌与释放促肾上腺皮质激素(ACTH),进而促进皮质醇(CORT)的合成,从而使机体的免疫应答等反应减弱,使机体处于一种紧张、焦虑、失眠的状态^[23],进而证实了该模型的可靠性。

TMJ 病理状态下主要表现为髁突软骨表面胶原松解、剥

脱,软骨细胞层厚度减低或细胞数量减少,关节盘胶原断裂;滑膜水肿或炎性渗出;髁突骨髓腔纤维化、骨组织破坏^[5,20,24]。本研究结果表明,大鼠 TMJ 发生病理性改变可能与大鼠慢性睡眠障碍密切相关,而这种病理性变化可能与大鼠口腔的副功能活动,如睡眠障碍状态下下颌系统中夜磨牙、紧咬牙等副功能活动或明显增加,进而增加 TMJ 的负担,对关节造成影响。在我们的前期研究中发现,大鼠睡眠剥夺能引起 TMJ 滑膜组织中 TNF α 、IL-1 β 、cox-2 及 IL-6 等炎症因子表达量增高^[15]。因此,我们认为慢性睡眠障碍能够引起 TMJ 变化是口腔系统功能状态与关节内炎症因子等因素的多重作用结果。

综上,本研究通过 HE 染色、扫描电镜的方法对颞下颌关节微结构改变进行观察,证实了慢性睡眠剥夺能够引起颞下颌关节微结构发生病理性改变,并对其可能机制进行了探讨。而睡眠障碍对颞下颌关节损伤的确切机制和预防治疗措施尚需进一步的研究和探讨。

参考文献(References)

- [1] Rafael P, Jose V B, Jose MS, et al. Temporomandibular disorders. A case-control study [J]. Med Oral Patol Oral Cir Bucal, 2012, 17 (5): e794-800
- [2] Yap AU, DworhinSF, Chua EK, et al. Prevalence of temporomandibular disorder subtypes, psychologic distress, and psychosocial dysfunction in Asian patients[J]. J Orofac Pain, 2003, 17 (1): 21-28
- [3] Tanaka E, Detamore MS, Mercuri LG, et al. Degenerative disorders of the temporomandibular joint: etiology, diagnosis, and treatment [J]. J Dent Res, 2008, 87(4): 296-307
- [4] Dinizl MR, Sabadin PA, Leite FP, et al. Psychological factors related to temporomandibular disorders: an evaluation of students preparing for collegeentrance examinations [J]. Acta Odontol. Latinoam, 2012, 25(1): 74-81
- [5] Wu GY, Chen L, Huang F, et al. Psychological stress may contribute to temporomandibular joint disorder in rats[J]. J Surg Res, 2013, 183(1): 223-229
- [6] kerstedt T. Psychosocial stress and impaired sleep [J]. Scand J Work Environ Health, 2006, 32(6): 493-501
- [7] McEwen BS. Sleep deprivation as a neurobiologic and physiologic stressor: allostasis and allostatic load [J]. Metabolism, 2006, 55(2): 20-23
- [8] Simor P, Zavecz Z, Pá losi V, et al. The influence of sleep complaints on the association between chronotype and negative emotionality in young adults[J]. Chronobiol Int, 2014 [Epub ahead of print]
- [9] Elmenhorsta D, Basheer R, McCarley RW, et al. Sleep deprivation increases A1 adenosine receptor density in the rat brain[J]. Brain Res, 2009, 1258: 53-58
- [10] Cheng TO. Effect of sleep deprivation on cardiovascular health[J]. Int J Cardiol, 2010, 138(1): 106
- [11] Born J, Lange T, Hansen K, et al. Effects of sleep and circadian rhythm on human circulating immune cells[J]. J Immunol, 1997, 158 (9): 4454-4464
- [12] José C Rosa Neto, Fá bio S Lira, Daniel P Venancio, et al. Sleep deprivation affects inflammatory marker expression in adipose tissue [J]. Lipids in Health and Disease, 2010, 9: 125-131
- [13] Redwine L, Hauger RL, Gillin JC, et al. Effects of sleep and sleep deprivation on interleukin-6, growth hormone, cortisol, and melatonin levels in humans [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2000, 85 (10): 3597-3603
- [14] Vgontzas AN, Zoumakis E, Bixler EO, et al. Adverse effects of modest sleep restriction on sleepiness, performance, and inflammatory cytokines [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2004, 89(5): 2119-2126
- [15] Chen J, Wu G, Zhu G, et al. Influence of sleep deprivation on expression of MKK4 and c-fos in the mandibular condylar cartilage [J]. Br J Oral Maxillofac Surg, 2013, 51(8): e250-255
- [16] 王培欢, 吴高义, 朱国雄. 睡眠剥夺对大鼠咬肌氧化应激指标的影响[J]. 中华老年口腔医学杂志, 2013, 11(2): 79-82
Wang Pei-huan, Wu Gao-yi, Zhu Guo-xiong. Effects of Sleep Deprivation on the Oxidative Stress Indicators in Rat Masseter [J]. Chinese Journal Of Geriatric Dentistry, 2013, 11(2): 79-82
- [17] 王培欢, 吴高义, 李吉国, 等. 睡眠剥夺对大鼠行为学及咀嚼肌肌电图的影响[J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(09): 1645-1647
Wang Pei-huan, Wu Gao-yi, Li Ji-guo, et al. Effects of Sleep Deprivation on Praxiology and Electromyogram in Rat [J]. Chinese Library Classification, 2014, 14(09): 1645-1647
- [18] 王培欢, 吴高义, 何玉宏, 等. 睡眠剥夺对大鼠咬肌超微结构的影响[J]. 现代生物医学进展, 2013, 16(13): 3045-3047
Wang Pei-huan, Wu Gao-yi, He Yu-hong, et al. Study on the Influence of Sleep Dprivation to the Ultrastructures of Masseter Muscle in Rats[J]. Chinese Library Classification, 2013, 16(13): 3045-3047
- [19] Lautenbacher S, Kundermann B, Krieg JC. Sleep deprivation and pain perception[J]. Sleep Medicine Reviews, 2006, 10(5): 357-369
- [20] Wilcox S, Brenes GA, Levine D, et al. Factors related to sleep disturbance in older adults experiencing knee pain or knee pain with radiographic evidence of knee osteoarthritisFactors related to sleep disturbance in older adults experiencing knee pain or knee pain with radiographic evidence of knee osteoarthritis [J]. J Am Geriatr Soc, 2000, 48(10): 1241-1251
- [21] Selaimen CM, Jeronymo JC, Brilhante DP, et al. Sleep and depression as risk indicators for temporomandibular disorders in a cross-cultural perspective[J]. Int J Prosthodont, 2006, 19(2): 154-161
- [22] Suchecki D, Duarte PB, Tufik S. Sleep rebound in animals deprived of paradoxical sleep by the modified multiple platform method[J]. Brain Res, 2000, 875(1-2): 14-22
- [23] Engelmann M, Landgraf R, Wotjak CT. The hypothalamic-neurohypophyseal system regulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis under stress: an old concept revisited [J]. Front Neuroendocrinol, 2004, 25(3-4): 132-149
- [24] Li Q, Zhang M, Chen YJ, et al. Psychological stress alters microstructure of the mandibular condyle in rats [J]. Physiol Behav, 2013, 110-111: 129-139