

叶黄素对兔颞下颌关节软骨组织中PI3K/AKT信号通路和软骨细胞自噬的调控作用及其机制

安 玮^{1,2}, 买买提吐逊·吐尔地^{1,2}, 姚志涛^{1,2}

(1. 新疆医科大学第一附属医院 附属口腔医院口腔颌面创伤正颌外科, 新疆 乌鲁木齐 830000; 2. 新疆维吾尔自治区口腔医学研究所, 新疆 乌鲁木齐 830000)

[摘要] **目的:** 探讨叶黄素对创伤性颞下颌关节强直(TMJA)兔颞下颌关节软骨组织中磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(AKT)信号通路和软骨细胞自噬的调控作用,并阐明其作用机制。**方法:** 32只雄性新西兰大白兔分为假手术组、模型组、叶黄素组和3-甲基腺嘌呤(3-MA)(PI3K/AKT信号通路抑制剂)+叶黄素组,每组8只。模型组、叶黄素组和3-MA+叶黄素组建立兔TMJA模型,假手术组兔仅暴露组织不进行手术。叶黄素组兔给予10 mg·kg⁻¹叶黄素,3-MA+叶黄素组兔给予15 mg·kg⁻¹3-MA和10 mg·kg⁻¹叶黄素。所有药物均于手术后24 h开始通过兔耳缘静脉进行注射,每周1次,连续注射3个月。完成后取手术侧兔颞下颌关节软骨组织,HE染色评估各组兔颞下颌关节软骨组织病理形态表现,Western blotting法检测各组兔颞下颌关节软骨组织中PI3K、AKT、磷酸化AKT(p-AKT)、Beclin-1、自噬相关蛋白5(ATG5)、微管相关蛋白1轻链3-I(LC3-I)、微管相关蛋白1轻链3-II(LC3-II)、自噬受体蛋白(P62)、基质金属蛋白酶13(MMP-13)、解聚蛋白酶5(ADAMTS-5)、蛋白聚糖(aggre-can)和II型胶原(Col II)蛋白表达水平,透射电子显微镜法检测各组兔颞下颌关节软骨组织中自噬小体数。**结果:** 与假手术组比较,模型组兔颞下颌关节软骨组织病理评分升高($P<0.05$)。与假手术组比较,模型组兔颞下颌关节软骨组织中PI3K、p-AKT、aggre-can和Col II蛋白表达水平降低($P<0.05$),Beclin-1、ATG5、P62、MMP-13和ADAMTS-5蛋白表达水平及LC3-II/LC3-I比值升高($P<0.05$);与模型组比较,叶黄素组兔颞下颌关节软骨组织中PI3K、p-AKT、aggre-can和Col II蛋白表达水平升高($P<0.05$),Beclin-1、ATG5和p62蛋白表达水平及LC3-II/LC3-I比值降低($P<0.05$);与叶黄素组比较,3-MA+叶黄素组兔颞下颌关节软骨组织中PI3K、p-AKT、Beclin-1、ATG5和P62蛋白表达水平及LC3-II/LC3-I比值降低($P<0.05$),MMP-13和ADAMTS-5蛋白表达水平升高($P<0.05$),aggre-can和Col II蛋白表达水平降低($P<0.05$)。与假手术组比较,模型组兔颞下颌关节软骨组织中自噬小体数增多($P<0.05$);与模型组比较,叶黄素组兔颞下颌关节软骨组织中自噬小体数减少($P<0.05$);与叶黄素组比较,3-MA+叶黄素组兔颞下颌关节软骨组织中自噬小体数减少($P<0.05$)。**结论:** 叶黄素通过调控PI3K/AKT信号通路和软骨细胞自噬改善TMJA兔的颞下颌关节软骨损伤。

[关键词] 叶黄素;磷脂酰肌醇3-激酶;蛋白激酶B;颞下颌关节强直;软骨细胞自噬

[中图分类号] R782.6 **[文献标志码]** A

[收稿日期] 2024-11-21 **[录用日期]** 2025-04-10

[基金项目] 新疆维吾尔自治区科技厅自然科学基金项目(2022D01C251)

[作者简介] 安 玮(1987—),女,山西省运城市人,主治医师,在读博士研究生,主要从事口腔颌面部创伤与正颌及颞下颌关节疾病方面的研究。

[通信作者] 姚志涛,主任医师,硕士研究生导师(E-mail: 443433061@qq.com)

©《吉林大学学报(医学版)》编辑部,开放获取遵循CC BY-NC-ND协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

Regulatory effect of lutein on PI3K/AKT signaling pathway and chondrocyte autophagy in mandibular joint cartilage tissue of rabbits and its mechanism

AN Wei^{1,2}, MAIMAITITUXUN·Tuerdi^{1,2}, YAO Zhitao^{1,2}

(1. Department of Orthognathic Surgery for Oral and Maxillofacial Trauma, Affiliated Stomatology Hospital, First Affiliated Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China; 2. Institute of Stomatology, Xinjiang Uyghur Autonomous Region, Urumqi 830000, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the regulatory effect of lutein on the phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT) signaling pathway and chondrocyte autophagy in mandibular joint cartilage tissue of rabbits with traumatic temporomandibular joint ankylosis (TMJA), and to clarify its mechanism. **Methods:** Thirty-two male New Zealand white rabbits were divided into sham operation group, model group, lutein group, and 3-MA (PI3K/AKT signaling pathway inhibitor) + lutein group, and there were 8 rabbits in each group. The rabbit model of TMJA was established in model group, lutein group, and 3-MA+lutein group, while the rabbits in sham operation group only underwent tissue exposure without surgery. The rabbits in lutein group were administered $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ lutein, and those in 3-MA+lutein group were administered $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 3-MA and $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ lutein. All the drugs were injected via the marginal ear vein starting 24 h after surgery, once a week for 3 consecutive months. After completion, the cartilage tissue on the surgical side was collected. HE staining was used to evaluate the patho morphology of the mandibular joint cartilage tissue of the rabbits in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of PI3K, AKT, phosphorylated AKT (p-AKT), Beclin-1, autophagy-related protein 5 (ATG5), microtubule-associated protein 1 light chain 3- I (LC3- I), microtubule-associated protein 1 light chain 3- II (LC3- II), autophagy receptor protein (P62), matrix metalloproteinase 13 (MMP-13), a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs-5 (ADAMTS-5), aggrecan, and type II collagen (Col II) proteins in temporomandibular joint cartilage tissue of the rabbits in various groups; transmission electron microscopy was used to detect the numbers of autophagosomes in temporomandibular joint cartilage tissue of the rabbits in various groups. **Results:** Compared with sham operation group, the pathological score of mandibular joint cartilage tissue of the rabbits in model group was increased ($P < 0.05$). The Western blotting results showed that compared with sham operation group, the expression levels of PI3K, p-AKT, aggrecan, and Col II proteins in mandibular joint cartilage tissue of the rabbits in model group were decreased ($P < 0.05$), while the expression levels of Beclin-1, ATG5, P62, MMP-13, ADAMTS-5 proteins and ratio of LC3- II /LC3- I were increased ($P < 0.05$). Compared with model group, the expression levels of PI3K, p-AKT, aggrecan, and Col II proteins in mandibular joint cartilage tissue of the rabbits in lutein group were increased ($P < 0.05$), while the expression levels of Beclin-1, ATG5, P62 protein and ratio of LC3- II /LC3- I were decreased ($P < 0.05$). Compared with lutein group, the expression levels of PI3K, p-AKT, Beclin-1, ATG5, and ratio of LC3- II /LC3- I, and P62 proteins in mandibular joint cartilage tissue of the rabbits in 3-MA+ lutein group were decreased ($P < 0.05$), while the expression levels of MMP-13 and ADAMTS-5 proteins were increased ($P < 0.05$), and the expression levels of aggrecan and Col II proteins were decreased ($P < 0.05$). The transmission electron microscope observation results showed that compared with sham operation group, the number of autophagosomes in temporomandibular joint cartilage tissue of the rabbits in model group was increased ($P < 0.05$); compared with model group, the number of autophagosomes in temporomandibular joint

cartilage tissue of the rabbits in lutein group was decreased ($P<0.05$); compared with lutein group, the number of autophagosomes in temporomandibular joint cartilage tissue of the rabbits in 3-MA+lutein group was decreased ($P<0.05$). **Conclusion:** Lutein improves the mandibular joint cartilage tissue damage in the TMJA rabbits by regulating the PI3K/AKT signaling pathway and chondrocyte autophagy.

KEYWORDS Lutein; Phosphatidylinositol 3-kinase; Protein kinase B; Temporomandibular joint ankylosis; Chondrocyte autophagy

创伤性颞下颌关节强直 (traumatic temporomandibular joint ankylosis, TMJA) 以疾病或创伤后纤维或骨黏连为特征, 影响患者身心健康^[1]; 创伤是造成 TMJA 最常见的原因, 但 TMJA 的发病机制尚不清楚^[2-3]。由于缺乏相关治疗信息, 在临床实践中预防和治疗 TMJA 极具挑战性^[1], 因此深入探讨其发病机制并寻找有效的治疗靶点具有重要意义。软骨细胞在颞下颌关节的正常生理功能维持中起关键作用^[4-5]。软骨细胞自噬与颞下颌关节软骨病变的发生发展有密切关联^[6-7]。然而, 在 TMJA 中, 软骨细胞自噬的异常在疾病进程中的作用尚未完全明确。磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K) /蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT) 信号通路是细胞中重要的信号传导通路, 参与多种细胞功能的调控, 包括细胞增殖、分化和自噬^[8]。激活 PI3K/AKT 信号通路可明显改善软骨基质的降解并抑制软骨细胞的凋亡, 在软骨组织中, PI3K/AKT 信号通路的激活对于维持软骨细胞的稳态至关重要^[9-10]。

叶黄素是一种天然的类胡萝卜素, 具有多种生物学功能, 如抗氧化和抗炎等^[11-12], 叶黄素已被证明可以促进软骨细胞的增殖活性并抑制炎症反应^[13]和肠上皮细胞自噬^[14]。叶黄素能够通过调节 PI3K/AKT 信号通路抑制 PC12 细胞的氧化损伤和凋亡^[11]。然而, 在 TMJA 中叶黄素是否通过 PI3K/AKT 信号通路调节软骨细胞自噬尚未见报道。本研究探讨叶黄素通过 PI3K/AKT 信号通路在 TMJA 软骨细胞自噬中的作用及其机制, 旨在为 TMJA 的发病机制和治疗研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物、主要试剂和仪器 32 只雄性新西兰大白兔购于北京维通利华实验动物有限公司, 动物生产许可证号: SCXK (京) 2021-0011, 动物使用许可证号: SYXK (京) 2022-0052。叶黄素购于美国 Sigma-Aldrich 公司, HE 染色试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司。PI3K/AKT 抑制剂

3-甲基腺嘌呤 (3-methyladenine, 3-MA)、PI3K、AKT、磷酸化 AKT (phosphorylated AKT, p-AKT)、Beclin-1、自噬相关蛋白 5 (autophagy related protein 5, ATG5)、微管相关蛋白 1 轻链 3-I (microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3-I, LC3-I)、微管相关蛋白 1 轻链 3-II (microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3-II, LC3-II)、自噬受体蛋白 P62、基质金属蛋白酶 13 (matrix metalloproteinase 13, MMP-13)、含血小板应答蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶 5 (a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motif 5, ADAMTS-5)、聚集蛋白聚糖 (aggrecan)、II 型胶原 (type II Collagen, Col II)、磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 的一抗以及对应的二抗均购于美国 Cell Signaling Technology 公司。异氟醚麻醉采用美国 Harvard Apparatus 麻醉系统, Leica CM1950 冰冻切片机、Leica EG1150 石蜡包埋机和 Leica RM2235 旋转式切片机购于德国徕卡公司, Zeiss LSM 710 激光共聚焦显微镜购于德国蔡司公司。

1.2 实验动物分组和兔 TMJA 模型制备 本研究选用 32 只健康的成年雄性新西兰大白兔, 体质量 2.5~3.0 kg。所有动物实验均通过本院伦理委员会审批。在实验开始前适应性饲养 1 周。饲养条件为标准的实验动物房, 环境温度为 $(22\pm 2)^{\circ}\text{C}$, 相对湿度为 50%~60%, 光照周期为 12 h 光照/12 h 黑暗。兔自由摄食和饮水, 饮水每天早晨更换为新鲜的饮用水。32 只兔随机分为假手术组、模型组、叶黄素组和 3-MA+叶黄素组, 每组 8 只。

TMJA 模型的建立参照文献^[15-16]方法。对模型组、叶黄素组和 3-MA+叶黄素组兔进行全身麻醉, 采用 5% 异氟醚诱导, 2% 异氟醚维持。随后, 暴露颞下颌关节, 通过手术方式去除部分关节盘以诱导强直。假手术组兔仅暴露关节但不移除关节盘。术后所有兔均给予抗生素以预防感染。叶黄素组兔给予叶黄素, 剂量为 $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 3-MA 组兔

在叶黄素组兔基础上给予3-MA,剂量为 $15\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,所有药物均经耳缘静脉注射,每周1次,连续给予3个月。实验结束后,取兔的新鲜颞下颌关节软骨组织用于后续实验。

1.3 HE染色观察各组兔颞下颌关节软骨组织病理形态表现 兔软骨组织标本经10%中性甲醛固定48 h后,进行常规脱水、透明和浸蜡,石蜡包埋后切片,切片厚度为 $5\text{ }\mu\text{m}$ 。切片经二甲苯脱蜡至水,苏木素染液染色5 min,自来水冲洗后采用1%盐酸乙醇分化5 s,再用自来水返蓝。随后,伊红染液染色3 min,快速脱水、透明和中性树胶封片。染色后在显微镜下观察兔软骨细胞和基质的形态学变化。病理评分标准如下。①软骨细胞排列:0分,软骨细胞排列整齐;1分,软骨细胞排列轻微紊乱;2分,软骨细胞排列明显紊乱;3分,软骨细胞丧失排列,数量减少。②基质染色:0分,基质染色均匀,颜色深浅适中;1分,基质染色轻微不均匀;2分,基质染色明显不均匀;3分,基质染色极不均匀或出现脱色区域。③软骨层结构:0分,软骨层完整;1分,软骨结构轻微破坏;2分,软骨结构明显破坏;3分,软骨结构严重破坏或吸收。④炎症细胞浸润:0分,无炎症细胞;1分,少量炎症细胞浸润;2分,中等量炎症细胞浸润;3分,大量炎症细胞浸润。总评分范围为0~12分,评分越高代表兔软骨组织病理病变越严重。

1.4 Western blotting法检测各组兔颞下颌关节软骨组织中目的蛋白表达水平 软骨组织裂解后,采用RIPA裂解液提取总蛋白,BCA法检测蛋白浓度。取等量蛋白($30\text{ }\mu\text{g}$),经SDS-PAGE电泳分离后转膜至PVDF膜,膜采用5%脱脂奶粉封闭1 h,室温下孵育PI3K(1:500)、AKT(1:800)、p-AKT(1:1 000)、Beclin-1(1:900)、ATG5(1:600)、LC3- II(1:800)、LC3- I(1:500)、P62(1:800)、MMP-13(1:400)、ADAMTS-5(1:1 000)、aggrecan(1:800)、Col II(1:600)和GAPDH(1:10 000)的一抗过夜。次日洗膜后加入相应HRP标记的二抗(1:5 000),室温孵育1 h。采用ECL显影,采用Image J软件分析目的蛋白的灰度值,以GAPDH作为内参蛋白。目的蛋白表达水平=(观察组目的蛋白灰度值/观察组内参蛋白灰度值)/(对照组目的蛋白灰度值/对照组内参蛋白灰度值)。

1.5 透射电子显微镜法检测各组兔颞下颌关节软骨组织中自噬小体数 按照“1.2”步骤中的方法

取兔新鲜颞下颌关节软骨组织,采用电镜观察自噬小体。将 $1\text{ mm}\times 1\text{ mm}\times 1\text{ mm}$ 的软骨组织块置于2.5%的戊二醛溶液中于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下固定3 h。固定后,采用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)清洗组织3次,每次5 min,将组织置于1%四氧化锇溶液中,在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下轻轻振荡固定3 h。组织进一步经过梯度乙醇脱水,最后采用环氧丙烷处理。组织块经浸润并将树脂嵌入其中,制备厚度为70 nm的超薄切片。切片采用醋酸铀和枸橼酸铅进行对比染色。随机选择5个视野,采用JEOL JEM1230电子显微镜在120 kV电压下观察各个视野下的自噬小体,并进行计数。

1.6 统计学分析 采用GraphPad Prism 8统计软件对数据进行统计学分析。采用Shapiro-Wilk检验对数据进行正态性检验,以确定其分布形式。假手术组和模型组兔病理评分,各组兔颞下颌关节软骨组织中PI3K、AKT和p-AKT蛋白表达水平,各组兔颞下颌关节软骨组织中自噬相关蛋白表达水平,各组兔颞下颌关节软骨中自噬小体数均呈正态分布,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,2组间样本均数比较采用两独立样本 t 检验,多组间样本均数比较采用单因素方差分析,组间样本均数两两比较采用LSD- t 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

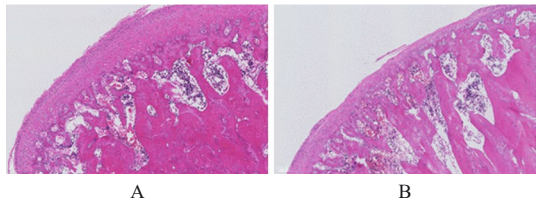
2 结 果

2.1 各组兔颞下颌关节软骨组织病理评分

与假手术组($0.00\text{ 分}\pm 0.00\text{ 分}$)比较,模型组兔颞下颌关节软骨组织病理评分($7.03\text{ 分}\pm 0.93\text{ 分}$)明显升高($P<0.05$),说明成功建立了TMJA兔模型。假手术组兔软骨组织完整结构,软骨细胞排列整齐,软骨层与软骨下骨交界规整。模型组兔软骨组织可见明显退行性改变,软骨层减少,软骨层与软骨下骨交界不规则,细胞排列紊乱。兔颞下颌关节软骨组织病理形态表现见图1。

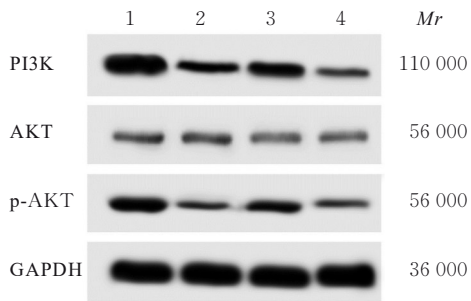
2.2 各组兔颞下颌关节软骨组织中PI3K、AKT和p-AKT蛋白表达水平

与假手术组比较,模型组兔颞下颌关节软骨组织中PI3K和p-AKT蛋白表达水平降低($P<0.05$);与模型组比较,叶黄素组和3-MA+叶黄素组兔颞下颌关节软骨组织中PI3K和p-AKT蛋白表达水平升高($P<0.05$);与叶黄素组比较,3-MA+叶黄素组兔颞下颌关节软骨组织中PI3K和p-AKT蛋白表达水平均降低($P<0.05$)。各组兔颞下颌关节软骨组织中AKT蛋白表达水平比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。见图2和表1。



A:Sham operation group; B:Model group.
图 1 假手术组和模型组兔颞下颌关节软骨组织病理形态表现(HE, ×100)

Fig. 1 Pathomorphology of temporomandibular joint cartilage tissue of rabbits in sham operation group and model group (HE, ×100)



Lane 1: Sham operation group; Lane 2: Model group; Lane 3:Lutein group; Lane 4:3-MA+lutein group.

图 2 各组兔颞下颌关节软骨组织中 PI3K、AKT 和 p-AKT 蛋白表达电泳图

Fig. 2 Electrophoregram of expressions of PI3K, AKT, and p-AKT proteins in temporomandibular joint cartilage tissue of rabbits in various groups

表 1 各组兔颞下颌关节软骨组织中 PI3K、AKT 和 p-AKT 蛋白表达水平

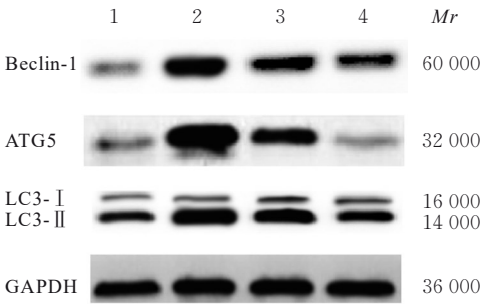
Tab. 1 Expression levels of PI3K, AKT, and p-AKT proteins in temporomandibular joint cartilage tissue of rabbits in various groups (n=8, $\bar{x} \pm s$)

Group	PI3K	AKT	p-AKT
Sham operation	1.00±0.13	1.00±0.09	1.00±0.07
Model	0.29±0.05*	1.00±0.15	0.11±0.04*
Lutein	0.56±0.06* [△]	1.00±0.08	0.29±0.03* [△]
3-MA+lutein	0.26±0.04* ^{△#}	1.05±0.07	0.17±0.08* ^{△#}
F	233.154	1.582	205.018
P	<0.01	0.743	<0.01

*P<0.05 compared with sham operation group; [△]P<0.05 compared with model group; [#]P<0.05 compared with lutein group.

2.3 各组兔颞下颌关节软骨组织中自噬相关蛋白表达水平 与假手术组比较,模型组兔颞下颌关节软骨组织中Beclin-1和ATG5蛋白表达水平及LC3-Ⅱ/LC3-I比值升高(P<0.05);与模型组比较,叶

黄素组和3-MA+叶黄素组兔颞下颌关节软骨组织中Beclin-1和ATG5蛋白表达水平及LC3-Ⅱ/LC3-I比值降低(P<0.05);与叶黄素组比较,3-MA+叶黄素组兔颞下颌关节软骨组织中Beclin-1和ATG5蛋白表达水平及LC3-Ⅱ/LC3-I比值降低(P<0.05)。见图3和表2。



Lane 1: Sham operation group; Lane 2: Model group; Lane 3:Lutein group; Lane 4:3-MA+lutein group.

图 3 各组兔颞下颌关节软骨组织中自噬相关蛋白表达电泳图

Fig. 3 Electrophoregram of expressions of autophagy-related proteins in temporomandibular joint cartilage tissue of rabbits in various groups

表 2 各组兔颞下颌关节软骨组织中自噬相关蛋白表达水平

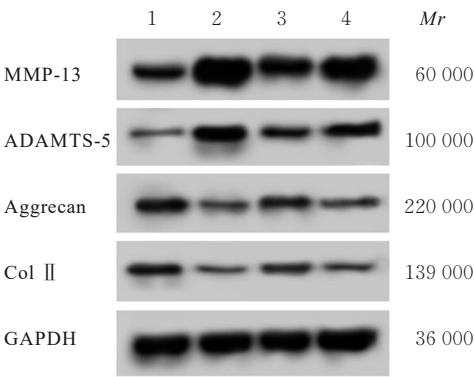
Tab. 2 Expression levels of autophagy-related proteins in temporomandibular joint cartilage tissue of rabbits in various groups (n=8, $\bar{x} \pm s$)

Group	Beclin-1	ATG5	LC3-Ⅱ/LC3-I ratio
Sham operation	1.00±0.13	1.00±0.04	1.00±0.09
Model	9.38±0.19*	14.09±1.35*	4.82±0.71*
Lutein	5.58±0.53* [△]	6.21±0.74* [△]	3.22±0.43* [△]
3-MA+lutein	3.21±0.27* ^{△#}	1.02±0.57* ^{△#}	1.13±0.14* ^{△#}
F	251.885	156.712	204.533
P	<0.01	<0.01	<0.01

*P<0.05 compared with sham operation group; [△]P<0.05 compared with model group; [#]P<0.05 compared with lutein group.

2.4 各组兔颞下颌关节软骨组织中软骨损伤相关蛋白表达水平 与假手术组比较,模型组兔颞下颌关节软骨组织中MMP-13和ADAMTS-5蛋白表达水平升高(P<0.05),aggrecan和ColⅡ蛋白表达水平降低(P<0.05);与模型组比较,叶黄素组和3-MA+叶黄素组兔颞下颌关节软骨组织中MMP-13和ADAMTS-5蛋白表达水平降低(P<0.05),aggrecan和ColⅡ蛋白表达水平升高(P<

0.05); 与叶黄素组比较, 3-MA+叶黄素组兔颞下颌关节软骨组织中 MMP-13 和 ADAMTS-5 蛋白表达水平升高 ($P<0.05$), aggrecan 和 Col II 蛋白表达水平降低 ($P<0.05$)。见图 4 和表 3。



Lane 1: Sham operation group; Lane 2: Model group; Lane 3: Lutein group; Lane 4: 3-MA+lutein group.

图4 各组兔颞下颌关节软骨组织中软骨损伤相关蛋白表达电泳图

Fig.4 Electrophoregram of expressions of cartilage injury-related proteins in temporomandibular joint cartilage tissue of rabbits in various groups

2.5 各组兔颞下颌关节软骨组织中自噬小体数

与假手术组比较, 模型组兔颞下颌关节软骨组织中自噬小体数增多 ($P<0.05$); 与模型组比较, 叶黄素组和 3-MA+叶黄素组兔颞下颌关节软骨组织中自噬小体数减少 ($P<0.05$); 与叶黄素组比较, 3-MA+叶黄素组兔颞下颌关节软骨组织中自噬小体数减少 ($P<0.05$)。见图 5 和表 4。

3 讨论

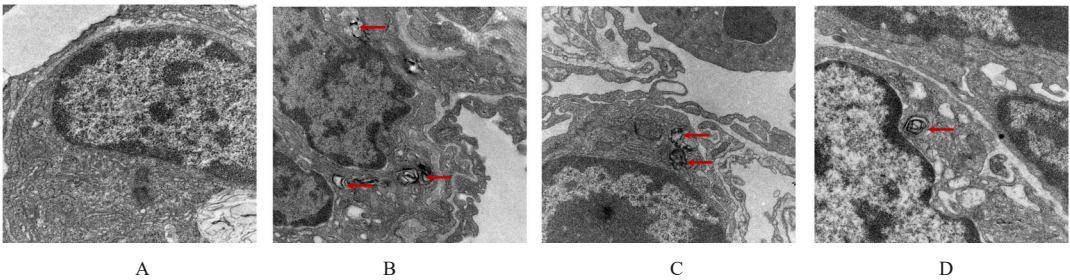
软骨细胞的自噬在关节疾病的发展过程中起复杂作用。研究^[7, 17]显示: 在骨关节炎等关节疾病中, 自噬功能失调与软骨损伤密切相关。细胞自噬与软骨损伤之间存在紧密关联^[17]。本研究结果表明: 叶黄素能够下调 Beclin-1、ATG5、LC3-II/LC3-I 比值和 P62 表达, 抑制过度的自噬反应, 从而改善软骨细胞功能。自噬小体的形成是细胞自噬过程中的重要步骤, 其数量的变化直接反映了自噬活动水平^[7]。在本研究中, 模型组中自噬小体数的增加提示自噬活动的过度活跃, 而叶黄素的干预明显减少了自噬小体的数量, 表明叶黄素可能通过调节自噬小体的形成, 恢复细胞内环境的稳态, 从而减轻软

表3 各组兔颞下颌关节软骨组织中软骨损伤相关蛋白表达水平

Tab.3 Expression levels of cartilage injury-related proteins in temporomandibular joint cartilage tissue of rabbits in various groups ($n=8, \bar{x}\pm s$)

Group	MMP-13	ADAMTS-5	aggrecan	Col II
Sham operation	1.00±0.15	1.00±0.02	1.00±0.11	1.00±0.12
Model	7.28±0.61*	5.17±0.41*	0.26±0.04*	0.17±0.02*
Lutein	3.30±0.72* [△]	2.37±0.17* [△]	0.58±0.10* [△]	0.64±0.08* [△]
3-MA+lutein	5.31±0.25* [△] #	4.39±0.48* [△] #	0.39±0.02* [△] #	0.41±0.05* [△] #
F	368.054	189.225	175.336	204.451
P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

* $P<0.05$ compared with sham operation group; [△] $P<0.05$ compared with model group; # $P<0.05$ compared with lutein group.



A: Sham operation group; B: Model group; C: Lutein group; D: 3-MA+lutein group. Red arrow indicated autophagosomes.

图5 透射电子显微镜观察各组兔颞下颌关节软骨组织中自噬小体数(×10 000)

Fig.5 Numbers of autophagosomes in temporomandibular joint cartilage tissue of rabbits in various groups observed under transmission electron microscope (×10 000)

表 4 各组兔颞下颌关节软骨组织中自噬小体数
Tab. 4 Numbers of autophagosomes in temporomandibular joint cartilage tissue of rabbits in various groups (n=8, $\bar{x}\pm s$)

Group	Number of autophagosomes
Sham operation	0.60±0.23
Model	3.20±0.15*
Lutein	1.80±0.05* [△]
3-MA+lutein	1.20±0.08* ^{△#}
F	485.392
P	<0.01

*P<0.05 compared with sham operation group; [△]P<0.05 compared with model group; [#]P<0.05 compared with lutein group.

骨损伤。该机制在关节疾病的治疗中具有重要价值，因为适度自噬有助于细胞的生存和再生，而过度自噬可能导致细胞死亡和组织损伤^[17]。因此，通过下调自噬相关蛋白的过度表达，叶黄素可能有效调节细胞中的代谢平衡，促进软骨细胞的存活和功能。本研究中，模型组兔颞下颌关节软骨组织中自噬相关蛋白的异常表达与兔软骨损伤相关蛋白的变化同时存在，MMP-13 和 ADAMTS-5 蛋白表达水平升高，而 aggrecan 和 Col II 蛋白表达水平降低，提示在 TMJA 的发展过程中，软骨细胞自噬的异常可能通过影响软骨的修复和软骨基质蛋白的代谢，从而导致软骨损伤。

叶黄素还具有抗氧化和抗炎的特性，能够减轻血管内皮细胞的损伤^[18-20]。研究^[13]显示：叶黄素可提高软骨细胞的活力，并通过增强抗氧化防御机制和减少氧化应激（活性氧和脂质过氧化）提供细胞保护作用。叶黄素通过下调炎症蛋白和促炎细胞因子表达表现出抗炎作用；叶黄素通过维持线粒体膜电位减少碘乙酸钠（sodium monoiodoacetate, MIA）诱导的细胞凋亡^[13]。叶黄素在 TMJA 中能够调节软骨细胞的自噬和软骨损伤相关蛋白的表达。上述结果均体现了叶黄素对细胞功能的调节作用。本研究表明：叶黄素对软骨自噬的调控机制可能与其在其他疾病中的作用机制存在部分共性，如通过调节信号通路来影响细胞的功能状态。

本研究结果显示：叶黄素抑制了过度的软骨损伤。在软骨损伤方面，叶黄素可下调 MMP-13 和 ADAMTS-5 蛋白表达水平，上调 aggrecan 和 Col II 蛋白表达水平。骨关节炎的相关研究^[21-22]显示：多种药物均可通过调节自噬相关蛋白来改善软骨损伤。研究^[23]显示：PI3K/AKT 信号通路的调节可

影响细胞自噬和细胞外基质蛋白的表达，进一步支持了本研究中叶黄素通过 PI3K/AKT 信号通路来调控软骨自噬和损伤的结论。

本研究结果显示：PI3K/AKT 信号通路的激活与软骨损伤相关蛋白表达有密切关联。当 PI3K 和 p-AKT 蛋白表达水平升高时，aggrecan 和 Col II 蛋白表达水平升高，MMP-13 和 ADAMTS-5 蛋白表达水平降低，表明 PI3K/AKT 信号通路的激活有助于软骨组织的修复。本研究结果与前期研究^[24]结果相符，即 PI3K/AKT 信号通路的正常功能对于维持软骨组织的稳态至关重要。PI3K/AKT 抑制剂 3-MA 的应用进一步证实了叶黄素通过 PI3K/AKT 信号通路治疗创伤性颞下颌关节软骨损伤并调节细胞自噬的机制。当加入 3-MA 时，叶黄素对 PI3K/AKT 信号通路的调节作用被削弱，同时软骨损伤相关蛋白的表达又恢复到类似模型组的状态，当加入 3-MA 时，软骨细胞自噬水平明显降低，表明 3-MA 能够特异性抑制 PI3K/AKT 信号通路，从而影响叶黄素的治疗效果。

综上所述，本研究建立了 TMJA 兔模型，并采用叶黄素进行治疗，叶黄素可通过调节 PI3K/AKT 信号通路和软骨细胞自噬，进而影响软骨损伤相关蛋白的表达，最终改善 TMJA 的软骨损伤。本研究结果为深入理解 TMJA 的发病机制和开发新的治疗方法提供了重要的理论依据。

利益冲突声明：
所有作者声明不存在利益冲突。
作者贡献声明：

安玮参与实验数据分析和论文撰写，买买提吐逊·吐尔地参与实验数据获取，姚志涛参与研究设计和论文审阅。

[参考文献]

[1] DENG T G, LIU C K, WU L G, et al. Association between maximum mouth opening and area of bony fusion in simulated temporomandibular joint bony ankylosis[J]. Int J Oral Maxillofac Surg, 2020, 49(3): 369-376.
[2] MA Z, WANG Y M, XUE Y, et al. Traumatic temporomandibular joint bony ankylosis in growing rats[J]. BMC Oral Health, 2022, 22(1): 585.
[3] MUBASHIR M M, RATTAN V, JOLLY S S. Differences in morphology of temporomandibular joint ankylosis of traumatic and infective origin[J]. Int J Oral Maxillofac Surg, 2023, 52(10): 1081-1089.

- [4] CORDOVA L A, REYES M, SOTO R, et al. Dysregulated healing response participates in the pathophysiology of temporomandibular joint ankylosis[J]. J Craniomaxillofac Surg, 2021, 49(7): 592-597.
- [5] ZHAO L, E X, HE L H, et al. Reducing macrophage numbers alleviates temporomandibular joint ankylosis[J]. Cell Tissue Res, 2020, 379(3): 521-536.
- [6] KAO W C, CHEN J C, LIU P C, et al. The role of autophagy in osteoarthritic cartilage [J]. Biomolecules, 2022, 12(10): 1357.
- [7] YANG H X, WEN Y, ZHANG M, et al. MTORC1 coordinates the autophagy and apoptosis signaling in articular chondrocytes in osteoarthritic temporomandibular joint[J]. Autophagy, 2020, 16(2): 271-288.
- [8] ZHENG X J, LI W, XU H L, et al. Sinomenine ester derivative inhibits glioblastoma by inducing mitochondria-dependent apoptosis and autophagy by PI3K/AKT/mTOR and AMPK/mTOR pathway [J]. Acta Pharm Sin B, 2021, 11(11): 3465-3480.
- [9] SHEN Q H, XIAO Y W, CHENG B, et al. PRMT1 promotes extracellular matrix degradation and apoptosis of chondrocytes in temporomandibular joint osteoarthritis *via* the AKT/FOXO1 signaling pathway [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2021, 141: 106112.
- [10] ZHOU L B, WU F, WANG J, et al. Effects of endoplasmic reticulum stress on chondrocyte apoptosis *via* the PI3K/AKT signaling pathway [J]. Tissue Cell, 2024, 87: 102340.
- [11] CHEN W, ZHANG H, LIU G S, et al. Lutein attenuated methylglyoxal-induced oxidative damage and apoptosis in PC12 cells *via* the PI3K/Akt signaling pathway[J]. J Food Biochem, 2022, 46(12): e14382.
- [12] EL-BAZ F K, SALAMA A, ALI S I, et al. Lutein isolated from *Scenedesmus obliquus* microalga boosts immunity against cyclophosphamide-induced brain injury in rats[J]. Sci Rep, 2022, 12(1): 22601.
- [13] QIAO Y Q, JIANG P F, GAO Y Z. Lutein prevents osteoarthritis through Nrf2 activation and downregulation of inflammation[J]. Arch Med Sci, 2018, 14(3): 617-624.
- [14] CHANG C J, LIN J F, HSIAO C Y, et al. Lutein induces autophagy *via* beclin-1 upregulation in IEC-6 rat intestinal epithelial cells[J]. Am J Chin Med, 2017, 45(6): 1273-1291.
- [15] TUNCEL U, KOSTAKOGLU N, TURAN A, et al. The use of temporalis muscle graft, fresh and cryopreserved amniotic membrane in preventing temporomandibular joint ankylosis after discectomy in rabbits[J]. J Craniomaxillofac Surg, 2014, 42(8): 1868-1876.
- [16] 米 娜, 安 玮, 金雪梅, 等. 叶黄素对兔创伤性颞下颌关节强直的预防作用研究[J]. 中国口腔颌面外科杂志, 2024, 22(3): 216-221.
- [17] YANG C, DONG W, WANG Y, et al. DDIT3 aggravates TMJOA cartilage degradation *via* Nrf2/HO-1/NLRP3-mediated autophagy [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2024, 32(8): 921-937.
- [18] ENĂȘESCU DA, MOISESCU MG, IMRE M, et al. Lutein treatment effects on the redox status and metalloproteinase-9 (MMP-9) in oral cancer squamous cells-are there therapeutical hopes?[J]. Materials (Basel), 2021, 14(11): 2968.
- [19] LI L H, LEE J C, LEUNG H H, et al. Lutein supplementation for eye diseases [J]. Nutrients, 2020, 12(6): 1721.
- [20] LIU Y, YANG G L, HUO S Q, et al. Lutein suppresses ferroptosis of cardiac microvascular endothelial cells *via* positive regulation of IRF in cardiac hypertrophy[J]. Eur J Pharmacol, 2023, 959: 176081.
- [21] SHEN B Y, WANG Y L, CHENG J Q, et al. Pterostilbene alleviated NAFLD *via* AMPK/mTOR signaling pathways and autophagy by promoting Nrf2[J]. Phytomedicine, 2023, 109: 154561.
- [22] JIN Z Z, CHANG B H, WEI Y L, et al. Curcumin exerts chondroprotective effects against osteoarthritis by promoting AMPK/PINK1/Parkin-mediated mitophagy[J]. Biomed Pharmacother, 2022, 151: 113092.
- [23] XU K, HE Y Z, MOQBEL S A A, et al. SIRT3 ameliorates osteoarthritis *via* regulating chondrocyte autophagy and apoptosis through the PI3K/Akt/mTOR pathway[J]. Int J Biol Macromol, 2021, 175: 351-360.
- [24] LU R, HE Z Y, ZHANG W K, et al. Oroxin B alleviates osteoarthritis through anti-inflammation and inhibition of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway and enhancement of autophagy [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2022, 13: 1060721.