

下颌后缩对大鼠记忆和认知功能的影响

李庆春^{1,2}, 韩全成^{1,2}, 刘小郁^{1,2}, 吴婷婷^{1,2}(¹ 安徽医科大学口腔医学院, 安徽医科大学附属口腔医院,² 安徽省口腔疾病研究重点实验室, 合肥 230032)

摘要 **目的** 本研究旨在探讨下颌后缩对大鼠脑功能的影响及其潜在机制。**方法** 3~4周(w)龄雄性SD大鼠随机分为对照组($n=10$), 下颌后缩(MR)组($n=30$, 其中MR组又分为1w、2w、4w共3个亚组, 每组10只)。MR组将改良金属套管粘接于大鼠上颌前牙舌侧, 迫使下颌产生2~2.5 mm的后退, 从而达到构建下颌后缩模型的目的; 对照组不给予任何干预措施。在造模后1w、2w、4w分别通过Morris水迷宫、Y迷宫、新物体识别实验等行为学实验探究下颌后缩对大鼠空间学习能力和记忆能力的影响。HE染色和尼氏染色观察海马组织CA1、CA3及DG区组织形态学的改变; 免疫组化检测海马体CA1、CA3及DG区原肌球蛋白激酶受体B(TrkB)的蛋白表达水平; Western blot检测海马组织TrkB/磷酸肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(AKT)通路的表达变化; qRT-PCR及Western blot定量分析海马体凋亡相关蛋白: Bcl-2相关X蛋白(Bax)、B细胞淋巴瘤-2蛋白(Bcl-2)、半胱天冬酶-3(Caspase-3)的变化。**结果** 行为学实验表明MR组, 尤其是MR 4w组在学习与空间记忆能力等方面较对照组、MR 1w、MR 2w组减弱($P<0.05$)。HE染色显示对照组锥体细胞排列整齐且形态规则, 而MR组大鼠海马CA1、CA3及DG区细胞数量减少, 排列稀疏不整齐, 核浓缩, 细胞腔隙变大; 尼氏染色显示MR组尼氏小体受损; 与此同时, MR组TrkB/PI3K/AKT信号通路被激活, p-TrkB、PI3K、p-AKT蛋白表达上调($P<0.05$); Western blot和qRT-PCR显示MR上调海马组织促凋亡蛋白Bax、凋亡效应蛋白Caspase-3的表达($P<0.05$), 抑制抗凋亡蛋白Bcl-2的表达($P<0.05$)。**结论** 下颌后缩损害大鼠脑功能, 影响认知与学习记忆能力, 可能通过调控TrkB/PI3K/AKT信号通路诱导海马神经元凋亡实现。

关键词 下颌后缩; 脑功能; 认知; TrkB; PI3K/AKT; 凋亡**中图分类号** R 783.5**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2025)09-1661-09

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.09.013

下颌后缩是骨性Ⅱ类错颌畸形中最常见的类型, 主要发生于青少年群体, 约占该类错颌畸形的50%~60%^[1], 不仅影响患者的面部外观和口腔功能, 还可能对身心发育产生深远影响。严重的下颌后缩可导致气道狭窄, 进而增加阻塞性睡眠呼吸暂停综合征(obstructive sleep apnea syndrome, OSAS)发生的风险^[2]。由于睡眠质量差和间歇性缺氧等, OSAS患者的学习能力显著下降, 尤其是在涉及高度集中和记忆的任务中表现较差。此外, 间歇性缺氧可引发神经元损伤, 尤其是在海马体和皮层, 导致认知功能障碍^[3]。

错颌畸形可导致颌位改变, 从而影响咀嚼和吞咽功能, 并进一步干扰口腔感觉信息的传递, 而这些感觉信息对大脑的学习和记忆功能至关重要^[4]。已有研究^[5]表明, 下颌前伸等颌位变化可能通过异常咬合对脑血流、空间记忆等产生负面影响, 然而, 关于下颌后缩对脑功能的影响研究较为有限。该研究构建大鼠下颌后缩模型, 并结合行为学、形态学及分子生物学的方法, 探讨下颌后缩对大鼠学习记忆和认知功能的影响, 并进一步研究其潜在机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 本实验采用SPF级3~4周龄雄性SD大鼠40只, 体质量150~180 g, 购自安徽省实验动物中心, 饲养于安徽医科大学实验动物中心。大鼠被随机分配, 每笼5只, 不限制所有大鼠的进食和饮水。动物房环境通风良好, 安静, 12 h/12 h明暗交替, 环境温度控制在24~26℃, 相对湿度50%~60%。所有大鼠在造模前进行适应性喂养1周, 本次实验研究得到了安徽医科大学实验动物伦理委员

2025-08-01 接收

基金项目: 安徽省高校科研计划项目(编号: 2022AH050734); 安徽医科大学口腔医学院(附属口腔医院)学科建设“峰原”合作项目(编号: 2022xkfys06、2022xkfyz03)

作者简介: 李庆春, 女, 硕士研究生;

吴婷婷, 女, 副教授, 硕士生导师, 通信作者, E-mail: wutingting_focus@163.com

会的批准(批号: T2022003)。

1.2 主要材料和仪器 2% 的戊巴比妥钠(美国 Sigma 公司, 货号: P3761); HE 染色试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒(上海碧云天生物有限公司, 货号: C0105S、P0012); 尼氏染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司, 货号: DK0022100); TRIzol(湖南艾科瑞生物有限公司, 货号: AG-TR-100); PrimeScript RT 试剂盒、NovoStart SYBR qPCR SuperMix Plus 试剂盒(日本 TaKaRa 公司, 货号: RR037Q、RR012A); PBS 缓冲液、柠檬酸盐抗原修复液、DAB 显色液(北京中杉金桥生物有限公司, 货号: ZLI-9061、ZLI-9064、ZLI-9017); 兔抗酪氨酸激酶受体 B(tropomyosin receptor kinase B, TrkB) 抗体、兔抗磷酸肌醇 3-激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K) 抗体(美国 Abcam 公司, 货号: ab187041、ab302958); 兔抗蛋白激酶 B(protein kinase B, AKT) 抗体、兔抗磷酸化 AKT(phospho-AKT Ser473, p-AKT) 抗体、兔抗磷酸化 TrkB(phospho-TrkB Tyr816, p-TrkB) 抗体、兔抗半胱天冬酶-3(cysteine-aspartic protease-3, Caspase-3) 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司, 货号: 9272、9271、4168、9662); 鼠抗 β -肌动蛋白(β -actin) 抗体、兔抗 Bcl2 关联 X 蛋白(Bcl2-associated X protein, Bax) 抗体、兔抗 B 细胞淋巴瘤-2 蛋白(B-cell lymphoma 2, Bcl-2) 抗体、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP) 标记的山羊抗兔二抗、HRP 标记的山羊抗鼠二抗(杭州华安生物技术有限公司, 货号: EM20112、SZ3-07、ET1702-53、HA1001、HA1006); 水迷宫、Y 迷宫、新物体识别实验箱(江苏赛昂斯生物科技有限公司, 货号: SA201M、SA204、SA225); 电泳仪、电泳槽、转膜槽、天能蛋白显影仪(上海天能有限公司, 型号: JY300C、HE-120、VE-186、Tanon 5200), Mx3000p qRT-PCR 系统(美国 Agilent 公司, 型号: Mx3000p)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物模型制备 经过 7 d 的适应期后, 40 只大鼠在造模前禁食 12 h, 所有 SD 雄性大鼠随机均分为对照组(ctrl / MR 0 d); 下颌后缩 1 周组(MR 1 w); 佩戴后缩装置 1 周; 下颌后缩 2 周组(MR 2 w): 佩戴后缩装置 2 周; 下颌后缩 4 周组(MR 4 w): 佩戴后缩装置 4 周。对照组不做任何处理, 下颌后缩组参考相关文献的造模方法并加以改进^[6], 将金属套筒消毒后根据需要预制特定形状粘接在老鼠上

颌前牙舌侧, 迫使下颌产生 2 ~ 2.5 mm 的后退, 以实现构建大鼠下颌后缩模型的目的。

1.3.2 Morris 水迷宫实验 本实验分为两个阶段: 空间探索阶段和定位航行阶段。空间探索: 每天大鼠从不同象限进入水池, 训练 60 s, 每天 4 次。如果大鼠在 1 min 内找不到目标平台, 则利用工具将其引导至平台, 并允许大鼠在目标平台上停留 15 s, 连续训练 4 d。定位航行: 从第 5 天开始, 撤去水下平台, 将大鼠从平台所在象限放入水中, 使用软件 SA201 V2.0 记录并分析大鼠的运动轨迹、潜伏期、穿越平台频率, 各象限及平台所在目标象限停留的时间和路程等活动数据, 作为评估大鼠学习和空间记忆能力的指标。

1.3.3 Y 迷宫实验 参考相关文献^[7] 设计了 Y 迷宫实验。Y 型迷宫装置是由 3 个相同的手臂(起始臂 I、新颖臂 II、其他臂 III)组成的 Y 形不透明树脂装置, 以用来检测啮齿动物的短期记忆和长期记忆。本实验由两部分组成。自主交替实验: 将所有大鼠从起始臂放入, 并在迷宫内自由活动 5 min, 记录其活动变化, 记录总进臂次数和自主交替行为; 空间认知测试实验: 关闭新颖臂, 让大鼠均在另外 2 个臂中自由探索 8 min; 2 h 后打开新颖臂, 使其自由活动 5 min, 记录在每个臂内的探索时间和路程以及进入各个臂的频率, 作为检测空间记忆的指标。

1.3.4 新物体识别实验 熟悉阶段: 大鼠被单独放在 1 个开放的场地中, 让其有 10 min 的时间探索场内的 2 个相同物体。测试阶段: 将 1 个物体替换为另 1 个新奇的物体, 依次将大鼠放入场地中自由探索 5 min, 准确记录每只大鼠与熟悉或新奇物体互动的次数, 旨在评估大鼠识别和区分新旧物体的能力。新物体识别指数计算公式为: 探索新物体的时间 / (探索新物体的时间 + 探索旧物体的时间)。

1.3.5 样本采集和处理 在最后 1 次行为学实验结束后 24 h 处死所有大鼠取脑组织。用戊巴比妥钠(60 mg/kg) 对大鼠实施安乐死, 并用生理盐水和 10% 甲醛溶液灌注。部分脑组织直接多聚甲醛固定, 用于后续组织学分析; 在冰上解剖其余脑组织海马体, 并立即放入 -80 °C 冰箱保存以便后期提取总蛋白和 RNA。

1.3.6 HE 染色与尼氏染色 脑切片脱蜡、脱水后, 苏木精染色 5 min, 水洗 1 min, 盐酸乙醇分化 30 s, 水洗 1 min, 碳酸锂蓝化 30 s, 水洗 2 min, 伊红染

色 5 s, 水洗 2 min, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透化, 中性树胶封片后在显微镜下观察。使用尼氏染色试剂盒对切片进行染色, 严格遵守制造商的指南, 以突出神经元结构, 便于详细的组织学检查。

1.3.7 免疫组化实验 脑切片经二甲苯脱蜡后, 进行抗原修复, 随后滴加 3% 过氧化氢 15 min 以阻断内源性过氧化物酶, 5% 山羊血清封闭 2 h, 弃封闭液后过夜孵育 TrkB 一抗 (1 : 50)。第 2 天 PBS 洗 3 次; 随后与 HRP 结合的 IgG 二抗室温孵育 60 min, PBS 洗 3 次, DAB 显色 1 min, 苏木精复染 2 min, 水洗 1 min, 盐酸乙醇分化 30 s, 水洗 1 min, 梯度乙醇脱水, 中性树胶封片后, 显微镜拍照观察。

1.3.8 Western blot 实验 加入 RIPA 裂解液在低温环境下研磨海马组织提取总蛋白, BCA 试剂盒检测蛋白浓度。基于目标蛋白的分子量选择 10% 或 15% 的 SDS-PAGE 凝胶用于电泳。随后转移到 PVDF 膜上进行转膜, 5% 脱脂牛奶中封闭 2 h。随后 TBST 洗 3 次, 并与针对特定靶标的一抗在 4 ℃ 摇床孵育 18 h, 所述靶标包括 β -actin (1 : 1 000)、TrkB (1 : 500)、PI3K (1 : 1 000)、AKT (1 : 1 000)、p-AKT (1 : 500)、Bax (1 : 800)、Bcl-2 (1 : 1 000)、Caspase-3 (1 : 5 000)。用相应的与 HRP 结合的 IgG 二抗 (1 : 5 000) 室温孵育 1 h。ECL 发光液以及天能蛋白显影仪检测蛋白条带, ImageJ 软件分析各条带灰度值。

1.3.9 qRT-PCR 检测 使用 TRIzol 提取海马组织总 RNA, 通过 PrimeScript RT 试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA。在 Mx3000p qRT-PCR 系统上使用 SYBR qPCR SuperMix Plus 反应混合试剂盒进行 qRT-PCR 分析。引物由上海生工生物有限公司合成。 β -actin 上游引物 5'-CTTAGTTGCGTTACACCTTTCTTG-3', 下游引物 5'-CTGTCACCTTCACCGTTCCAGTTT-3'; Bax 上游引物 5'-TTGCTA CAGGGTTTCATCCA-3', 下游引物 5'-GAGTACCTGAACCGGCATCT-3'; Bcl-2 上游引物 5'-GAGTACCTGAACCGGCATCT-3', 下游引物 5'-GAAATCAAACAGAGGTCGCA-3'; Caspase-3 上游引物 5'-GTACAGAGCTGGACTGCGGTATTG-3', 下游引物 5'-AGTCGGCCTCCACTGGTATCTTC-3'。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 25.0 和 GraphPad Prism 9.0 软件进行实验结果的统计分析。所有结果均以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。两组间的比较采用 t 检验, 多组间的比较采用单因素方差分析, 并

进行 Tukey 事后检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 下颌后缩对大鼠认知与学习记忆能力的影响

为了评估下颌后缩对大鼠脑功能的影响, 首先利用改良金属套管套构建大鼠下颌后缩模型。造模 4 周后前牙的覆盖由 2 ~ 2.5 mm 变为 4 ~ 5 mm, 由此证明此改良金属套管实现下颌后缩的可行性。见图 1。分别在 MR 1 w、MR 2 w 和 MR 4 w 时, 采用 Morris 水迷宫、Y 迷宫和新物体识别实验评估了大鼠的学习、记忆和认知能力。在水迷宫实验中, 不同的搜索策略代表大鼠寻找平台所采用的不同方法。经过 4 d 的训练后, 对照组大鼠的搜索策略从外周和随机模式转变为更为直接的模式, 而 MR 组大鼠仍维持外周和不规则的模式 (图 2A)。这表明与对照组相比, MR 组大鼠的空间记忆和学习能力有所下降。逃避潜伏期的结果显示, MR 1 w 组 (21.66 ± 1.86) s 与对照组 (17.42 ± 1.13) s 之间无显著差异。然而, 随着时间的延长, MR 组大鼠的逃避潜伏期逐渐增加, 差异有统计学意义 ($F_{趋势} = 52.80, P < 0.05$)。此外, 随着时间的延长, MR 组大鼠的平台穿越次数呈进行性减少, 差异有统计学意义 ($F_{趋势} = 72.91, P < 0.05$)。同样地, MR 2 w 组和 MR 4 w 组大鼠在目标象限停留的时间也少于对照组 ($t = 4.47, 7.96, P < 0.05$)。见图 2B - 2D。这表明随着时间推移, 下颌后缩会导致大鼠的记忆功能逐渐减退。

为了进一步验证下颌后缩对脑功能的影响, 进行了 Y 迷宫测试。Y 迷宫的轨迹图清晰地显示了不同组大鼠的运动轨迹。MR 1 w 组 (72.46 ± 1.88) % 大鼠的自主交替正确率没有明显变化。然而, MR 2 w 组 (55.73 ± 4.62) %、MR 4 w 组 (38.31 ± 4.36) % 与对照组 (75.66 ± 3.30) % 相比自主交替正确率降低 ($t = 5.05, 8.13, P < 0.05$), 这表明大鼠认知灵活性下降。此外, 空间记忆评估结果显示, 随着时间的推移, 与对照组 (62.77 ± 3.47) % 相比, MR 组大鼠在新颖臂停留的时间的占比减少 [MR 1 w: (48.29 ± 3.48) %, MR 2 w: (38.70 ± 1.86) %, MR 4 w: (20.97 ± 1.43) %, $t = 3.76, 6.26, 10.86, P < 0.05$], 表明大鼠的空间记忆能力受损。见图 2E - 2G。最后, 新物体识别实验结果表明 (图 2H、2I), 在造模 2 周和 4 周后, MR 2 w 和 MR 4 w 组大

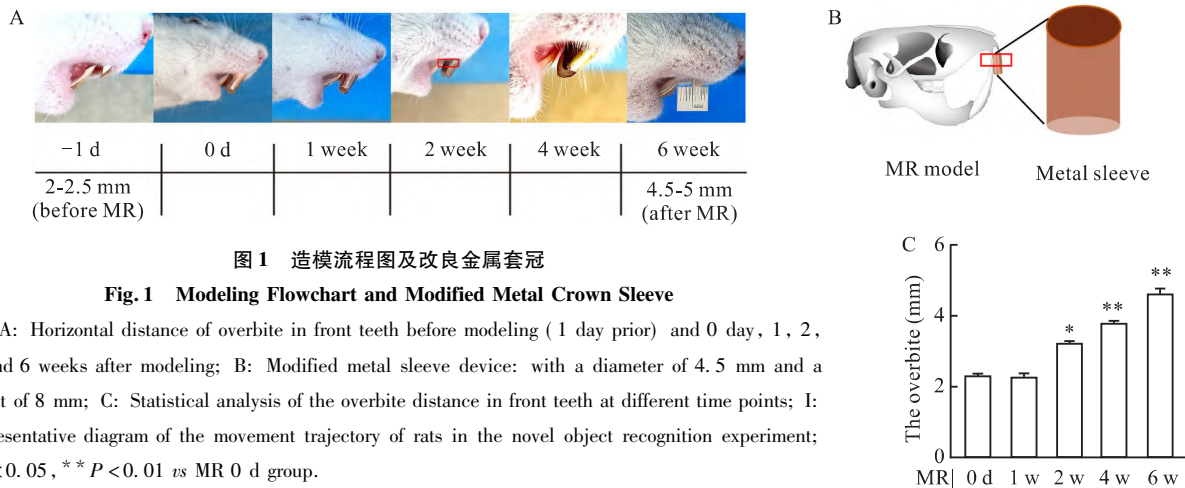


图1 造模流程图及改良金属冠冠

Fig.1 Modeling Flowchart and Modified Metal Crown Sleeve

A: Horizontal distance of overbite in front teeth before modeling (1 day prior) and 0 day, 1, 2, 4, and 6 weeks after modeling; B: Modified metal sleeve device: with a diameter of 4.5 mm and a height of 8 mm; C: Statistical analysis of the overbite distance in front teeth at different time points; I: Representative diagram of the movement trajectory of rats in the novel object recognition experiment; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs MR 0 d group.

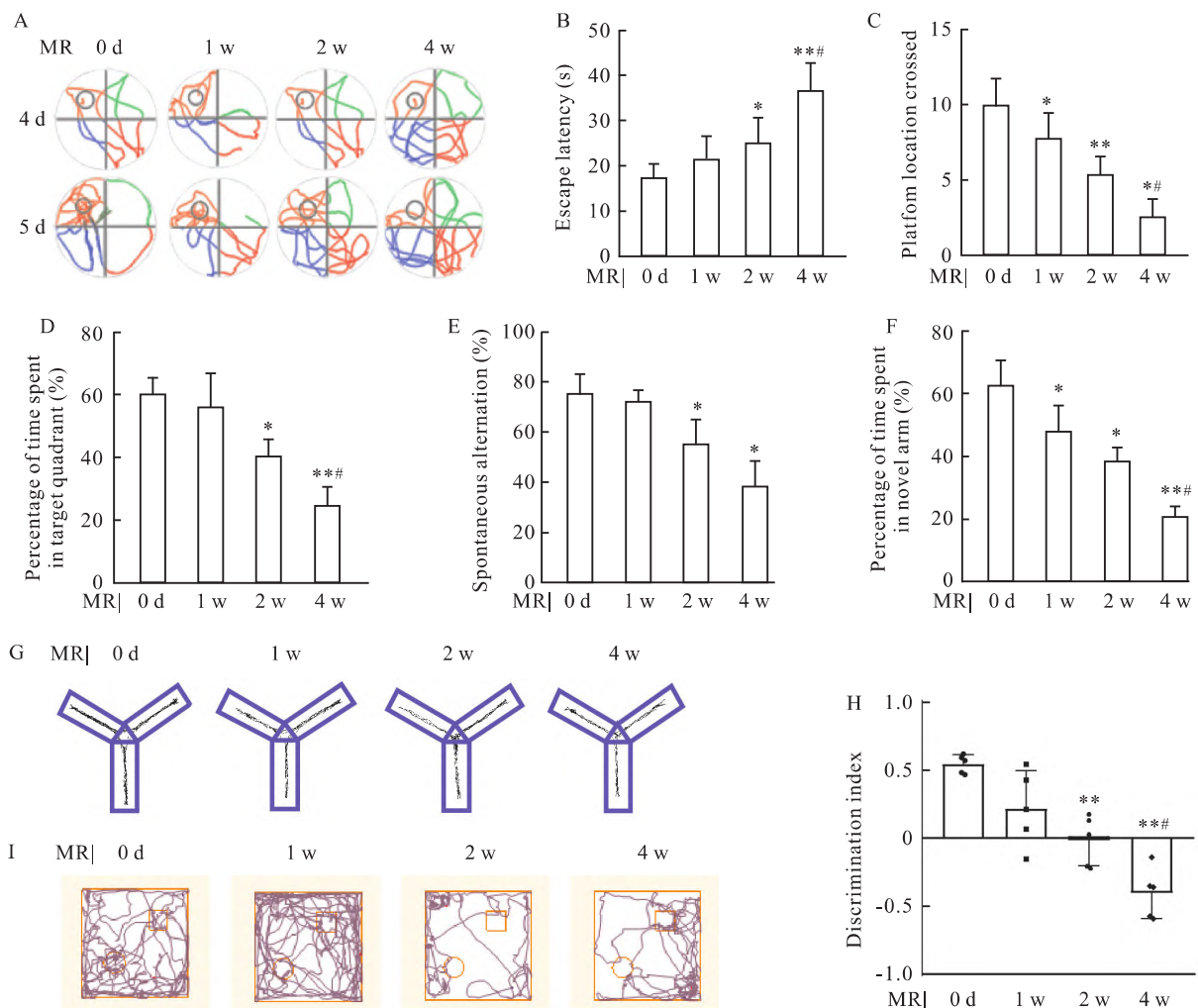


图2 下颌后缩对大鼠认知与学习记忆能力的影响

Fig.2 The impact of mandibular retrusion on cognitive, learning, and memory abilities of rats

A: Representative motion trajectory diagrams for the fourth day of spatial exploration and the fifth day of place navigation; B: Comparison of escape latency among groups; C: Comparison of platform crossings within 60 s among groups; D: Comparison of time spent in target quadrant (%) among groups; E: Comparison of spontaneous alternation accuracy among groups; F: Percentage of time spent in the novel arm across groups; G: Representative motion trajectory diagrams in the Y-Maze; H: Comparison of novel object recognition index among groups; I: Representative diagram of the movement trajectory of rats in the novel object recognition experiment; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs MR 0 d group; # $P < 0.05$ vs MR 2 w group.

鼠的新物体识别指数低于对照组,差异有统计学意义($t=4.56, 7.71, P<0.05$)。新物体识别实验期间大鼠运动轨迹的代表图进一步验证了MR对大鼠记忆的不利影响。

2.2 下颌后缩导致大鼠海马神经元的形态学改变

海马中的CA1、CA3、DG区锥体神经元对于空间信息处理和记忆至关重要。通过HE染色观察大鼠海马体CA1、CA3、DG区形态学改变,对照组海马各分区锥体神经元排列规整,胞浆丰富,胞核较大;与对照组相比,MR组海马区神经元排列较为紊乱且稀疏,细胞质浓缩深染,细胞核固缩、深染(图3A)。各组海马组织的尼氏染色结果显示(图3B),在对照组中,细胞核仁清晰,尼氏小体明显。相反,MR组随着时间的延长尼氏小体明显受损,染色变浅,核染色质凝聚。上述结果表明,大鼠下颌后缩使负责管

理认知功能的大脑区域发生了改变。

2.3 下颌后缩激活 TrkB/PI3K/AKT 通路的表达

海马和大脑皮层 TrkB 表达的变化会影响认知功能。通过免疫组化染色对海马组织特定区域 TrkB 的表达进行定量分析。结果显示 TrkB 在 MR 组海马中的表达随时间而变化。与对照组相比,CA1 区的 TrkB 表达在 MR 2 w 组、MR 4 w 组明显增加($t=14.10, 23.73, P<0.05$),MR 4 w 组较 MR 2 w 组也增加($t=9.63, P<0.05$)。在 CA3 和 DG 区,MR 1 w、2 w 和 4 w 组与对照组相比,差异均有统计学意义(CA3: $t=6.26, 15.90, 28.74, P<0.05$; DG: $t=3.99, 11.94, 17.42, P<0.05$)。此外,在 CA3 和 DG 区中,与 MR 2 w 组相比,MR 4 w 组中 TrkB 的表达增加($t=12.85, 5.48, P<0.05$)。见图 4。

Western blot 结果显示,随着时间的延长,MR 组

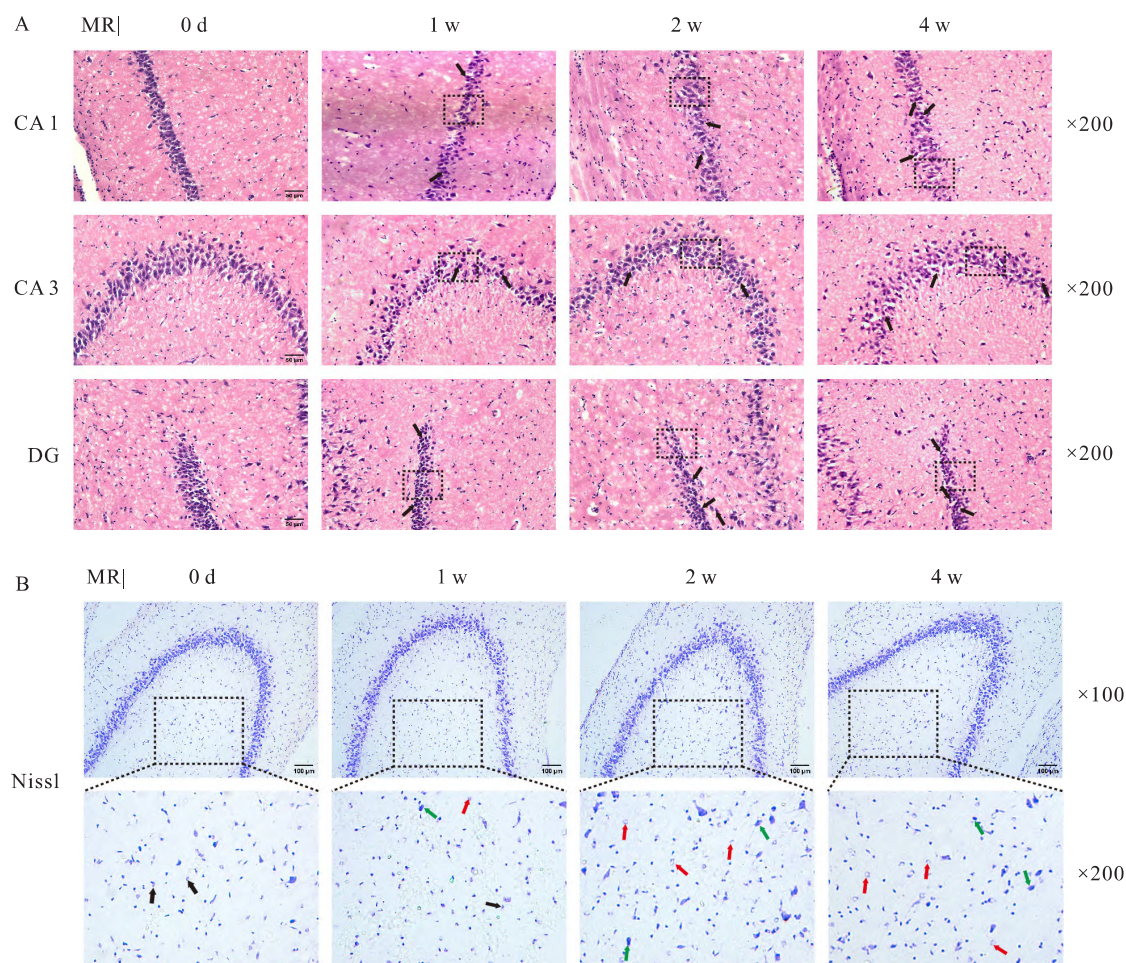


图3 海马组织 HE、尼氏染色结果

Fig.3 The results of HE and Nissl staining in hippocampal

A: Representative images of H&E staining in different functional areas (CA1, CA3, DG) of the hippocampus; Black square: Area of sparse cell arrangement; Black arrow: Pyknotic nucleus; B: Representative images of Nissl staining in the hippocampus; Black arrow: Normal Nissl bodies; Red arrow: Damaged Nissl bodies; Green arrow: Chromatin condensation in the nucleus.

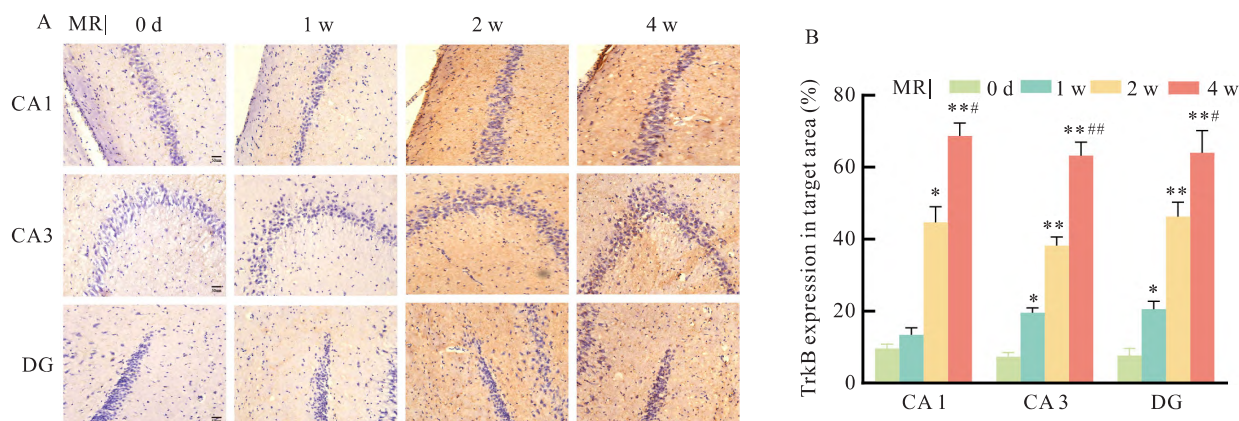


图4 下颌后缩增加 TrkB 的表达

Fig. 4 Mandibular retraction increased TrkB expression

A: Immunohistochemistry images of TrkB proteins in different functional divisions (CA1, CA3, DG) in the hippocampus $\times 200$; B: Quantitative analysis of TrkB positive areas; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs MR 0 d group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs MR 2 w group.

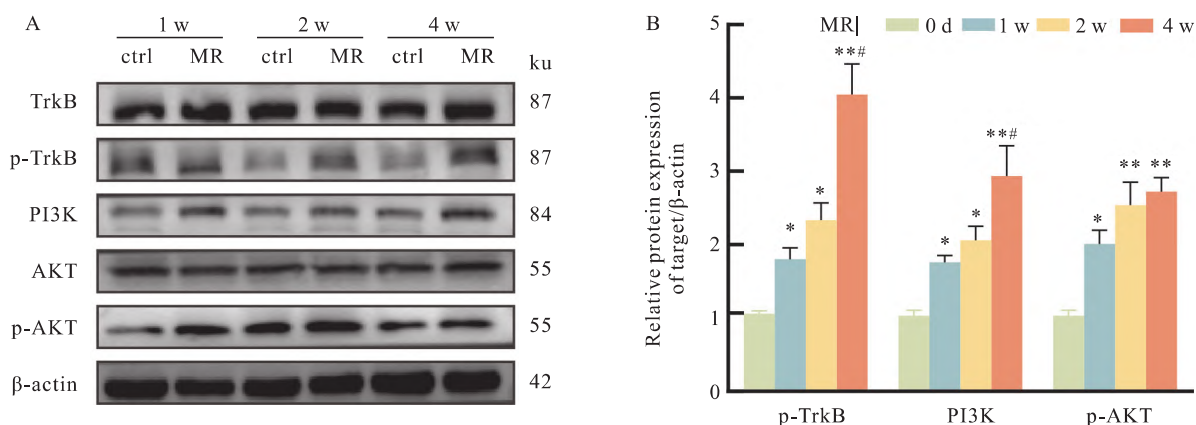


图5 下颌后缩激活 TrkB/PI3K/AKT 通路的表达

Fig. 5 Mandibular retraction activated the expression of the TrkB/PI3K/AKT pathway

A: Western blot analysis of the expression levels of TrkB, p-TrkB, PI3K, AKT and p-AKT in each group; B: Quantitative analysis of the expression levels of p-TrkB, PI3K and p-AKT; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs MR 0 d group; # $P < 0.05$ vs MR 2 w group.

TrkB 的磷酸化水平逐渐上调 ($F_{趋势} = 211.6$, $P < 0.05$), p-TrkB 在 MR 4 w 组的表达相比对照组明显升高 ($t = 14.48$, $P < 0.01$)。在 TrkB 变化的相关机制筛选中,本研究重点关注 PI3K/AKT 通路。Western blot 结果显示,与对照组相比,PI3K 的表达从 MR 1 w 开始升高 ($t = 3.83$, $P < 0.05$),MR 4 w 时出现更为明显的升高 ($t = 9.96$, $P < 0.01$),且 MR 4 w 组与 MR 2 w 组相比差异也有统计学意义 ($t = 4.57$, $P < 0.05$)。AKT 在各组之间无显著变化,但 p-AKT 的表达量随时间变化而增加 ($F_{趋势} = 107.3$, $P < 0.05$)。以上结果表明下颌后缩激活了大鼠海马组织 PI3K/AKT 信号通路。见图 5。

2.4 PI3K/AKT 通路促进海马神经元凋亡

PI3K/AKT 通路与细胞凋亡密切相关。通过 West-

ern blot 和 PCR 检测各组大鼠海马组织中凋亡相关分子的表达。结果表明,随着时间的推移,促凋亡蛋白 Bax 的表达水平增加 ($F_{趋势} = 150.6$, $P < 0.05$),其中 MR 2 w 组、MR 4 w 组较对照组差异有统计学意义 ($t = 7.27, 10.88$, $P < 0.05$)。Bax 的 mRNA 表达水平也显示出相同的趋势 ($F_{趋势} = 614.1$, $P < 0.05$),同时抗凋亡蛋白 Bcl-2 的 mRNA 和蛋白水平随时间增加而降低 ($F_{趋势} = 549.7, 467.9$, $P < 0.05$)。其次经典凋亡效应蛋白 Caspase-3 的蛋白和 mRNA 表达水平在 MR 2 w 和 MR 4 w 组也增加 (蛋白: $t = 13.27, 14.80$, $P < 0.01$; mRNA: $t = 11.25, 22.02$, $P < 0.05$),这些数据表明下颌后缩海马组织中 PI3K/AKT 可能通过介导细胞凋亡,并进一步损伤脑认知功能。见图 6。

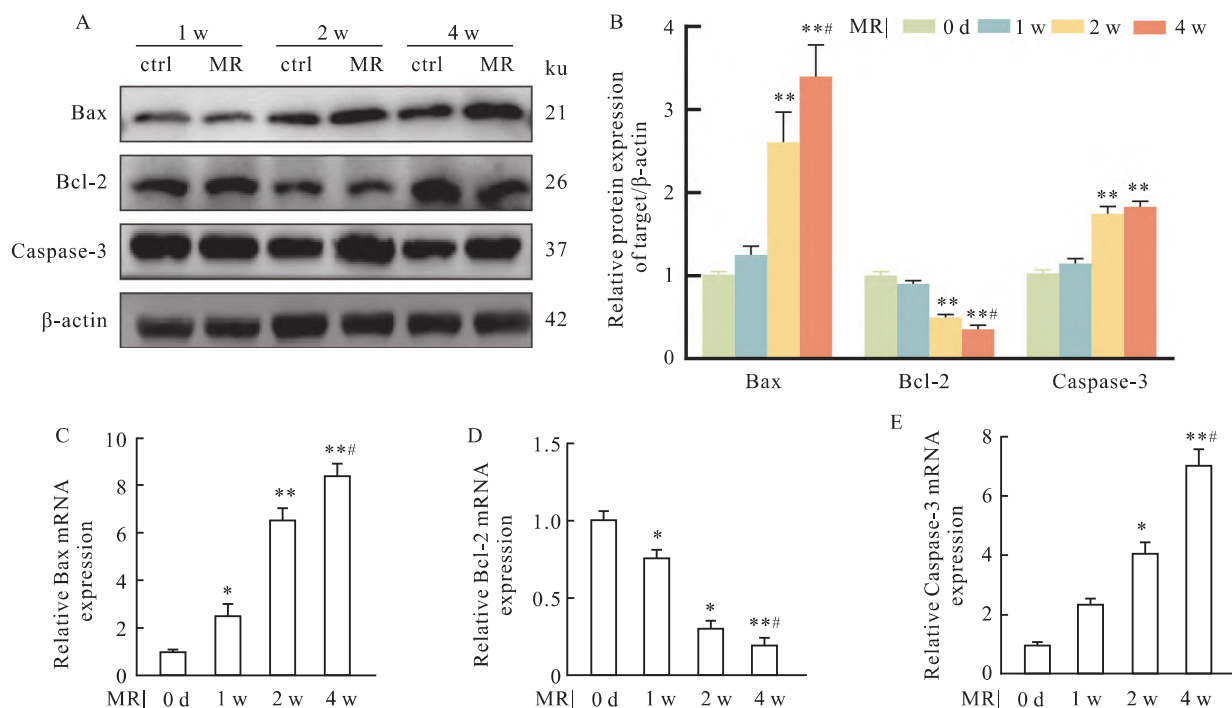


图6 PI3K/AKT 通路促进海马神经元凋亡

Fig. 6 PI3K/AKT pathway promoted the apoptosis of hippocampal neurons

A, B: Western blot analysis of Bax, Bcl-2, Caspase-3 protein expression levels and quantitative analysis; C - E: Relative mRNA expression of Bax, Bcl-2 and Caspase-3; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs MR 0 d group; # $P < 0.05$ vs MR 2 w group.

3 讨论

口腔健康与全身健康密切相关,中国错颌畸形的患病率高达 74%^[8]。近年来,随着人们对美观的需求不断增加,临床上骨性Ⅱ类伴下颌后缩的患者越来越多,该类畸形不仅导致咬合错乱,还严重影响颌面部美观。研究^[9]表明,下颌后缩对脑部血流有影响,而充足的血液供应对于维持脑细胞的正常功能至关重要。然而,目前关于下颌后缩对脑功能的影响研究较为匮乏,多数研究集中于其对咀嚼、吞咽和言语功能的影响^[9]。因此本研究旨在深入探究下颌后缩与脑功能,尤其是与学习记忆、认知功能之间可能存在的关联及其潜在机制。

在本研究初期,设计了一种改良金属套筒装置,用于构建稳定可靠的大鼠下颌后缩模型。相比以往通过橡胶或硅胶制作咬合斜面或铸造咬合诱导板的方法^[6],新装置具有制造简便、成本低、操作便捷且易于复制等优势,并能使大鼠下颌稳定后缩 2~2.5 mm。本研究选用 3~4 周龄的大鼠进行实验,因该阶段正处于骨改建活跃期,与临床中下颌后缩的发生阶段相对应,因此更具临床参考价值。

本研究行为学研究结果表明,下颌后缩导致大鼠认知和记忆功能受损。海马属于原始皮层,在学习、记忆及空间感知方面发挥重要作用。海马中的 CA1、CA3、DG 区锥体神经元对于空间信息处理和记忆至关重要^[10]。免疫组化结果显示 TrkB 在海马组织 CA1、CA3、DG 中表达上调,当 TrkB 的表达水平发生变化时,可能会影响到海马神经元的正常功能,进而对认知功能产生负面影响^[11]。这一作用可能与脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 信号通路改变所引发的神经发生、突触发生及突触可塑性的损害相关。BDNF 信号通路是由 TrkB 的改变介导的,BDNF 对中枢神经系统的调节依赖于其下游高亲和力和受体 TrkB 的结合^[12]。研究^[13]表明 TrkB 和 PI3K/AKT 通路相关蛋白质分子对大鼠学习和认知起着关键的调节作用。TrkB 可二聚化并激活 PI3K/AKT 信号通路,该通路与细胞凋亡过程密切相关,其中 Bcl-2、Bax 等蛋白能有效调控细胞凋亡^[14]。在本研究中,海马组织抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达的减少和促凋亡蛋白 Bax 表达的增加有效地激活了 Caspase-3 这一关键的凋亡执行蛋白,一旦 Caspase-3 被激活,就会启动一系列复

杂而有序的凋亡级联反应,最终导致海马神经元凋亡。海马神经元凋亡可能损害大脑记忆功能。作为记忆形成与存储的关键区域,海马在短期记忆向长期记忆转换过程中发挥重要作用。当海马神经元发生凋亡时,大脑信息的处理和存储能力受损,从而导致记忆障碍^[15]。因此,PI3K/Akt 信号通路可能被 MR 调控进而诱发神经元凋亡,影响大脑功能。

本研究仍存在一定的局限性。首先,实验动物选用 SD 大鼠,虽然该模型较为常用,但其与人类在解剖结构和生理特性上仍存在一定差异。为提高研究结果的外推性,后续研究可考虑使用与人类更为相似的灵长类动物(如猴子)。其次,本研究的造模观察时间较短,尚未充分评估下颌后缩在不同阶段对脑功能的长期影响,因此,延长观察周期并动态监测各项指标的变化将有助于更全面地揭示下颌后缩与脑功能损害之间的关系。此外,本研究的结论能否适用于临床仍需进一步的流行病学研究加以验证。

综上所述,下颌后缩不仅影响咀嚼效率,还损害大鼠的脑功能,影响其认知与学习记忆能力。这一效应可能是通过调控 TrkB/PI3K/AKT 信号通路诱导海马神经元凋亡所介导的。本研究的发现对口腔医学和神经科学领域的临床实践具有重要意义,为下颌后缩的干预策略及潜在的脑功能改善提供了科学依据。

参考文献

- [1] Luca L, Francesca C, Daniela G, et al. Cephalometric analysis of dental and skeletal effects of Carriere Motion 3D appliance for Class II malocclusion [J]. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 2022, 161(5): 659–65. doi: 10.1016/j.ajodo.2020.12.024.
- [2] Lavigne G J, Herrero Babiloni A, Beetz G, et al. Critical issues in dental and medical management of obstructive sleep apnea [J]. *J Dent Res*, 2020, 99(1): 26–35. doi: 10.1177/0022034519885644.
- [3] Beaudin A E, Younes M, Gerardy B, et al. Association between sleep microarchitecture and cognition in obstructive sleep apnea [J]. *Sleep*, 2024, 47(12): zsae141. doi: 10.1093/sleep/zsae141.
- [4] Misawa-Omori E, Okihara H, Ogawa T, et al. Reduced mastication during growth inhibits cognitive function by affecting trigeminal ganglia and modulating Wnt signaling pathway and ARHGAP33 molecular transmission [J]. *Neuropeptides*, 2023, 102: 102370. doi: 10.1016/j.npep.2023.102370.
- [5] Kanzaki H, Wada S, Kumazawa M, et al. Mandibular prognathism attenuates brain blood flow induced by chewing [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 19104. doi: 10.1038/s41598-019-55553-5.
- [6] Li W, Trbojevic S, Pineda-Farias J B, et al. Mandibular condylar process remodeling in rats with different bite-altering devices [J]. *Eur Cell Mater*, 2023, 45: 46–59. doi: 10.22203/eCM.v045a04.
- [7] d'Isa R, Comi G, Leocani L. Apparatus design and behavioural testing protocol for the evaluation of spatial working memory in mice through the spontaneous alternation T-maze [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 21177. doi: 10.1038/s41598-021-00402-7.
- [8] Lin M, Xie C, Yang H, et al. Prevalence of malocclusion in Chinese schoolchildren from 1991 to 2018: a systematic review and meta-analysis [J]. *Int J Paediatr Dent*, 2020, 30(2): 144–55. doi: 10.1111/ipd.12591.
- [9] Kariya C, Kanzaki H, Kumazawa M, et al. Skeletal anterior open bite attenuates the chewing-related increase in brain blood flow [J]. *Dent J (Basel)*, 2024, 12(6): 161. doi: 10.3390/dj12060161.
- [10] 屠心茹, 徐家雯, 刘锐, 等. 海马 CRHR1 调节慢性应激致老年前期小鼠学习记忆损伤的机制 [J]. *安徽医科大学学报*, 2024, 59(1): 117–26. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.01.019.
- [10] Tu X R, Xu J W, Liu R, et al. Mechanism of hippocampal CRHR1 regulating chronic stress-induced learning and memory impairment in early aged mice [J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2024, 59(1): 117–26. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.01.019.
- [11] Wang J, Yu H, Li X, et al. A TrkB cleavage fragment in hippocampus promotes depressive-like behavior in mice [J]. *Brain Behav Immun*, 2024, 119: 56–83. doi: 10.1016/j.bbi.2024.03.048.
- [12] Cao T, Matyas J J, Renn C L, et al. Function and mechanisms of truncated BDNF receptor TrkB.T1 in neuropathic pain [J]. *Cells*, 2020, 9(5): 1194. doi: 10.3390/cells9051194.
- [13] Sancho-Alonso M, Arenas Y M, Izquierdo-Altarejos P, et al. Enhanced activation of the S1PR2-IL-1 β -Src-BDNF-TrkB pathway mediates neuroinflammation in the hippocampus and cognitive impairment in hyperammonemic rats [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(24): 17251. doi: 10.3390/ijms242417251.
- [14] Tian Q, Guo Y, Feng S, et al. Inhibition of CCR2 attenuates neuroinflammation and neuronal apoptosis after subarachnoid hemorrhage through the PI3K/Akt pathway [J]. *J Neuroinflammation*, 2022, 19(1): 312. doi: 10.1186/s12974-022-02676-8.
- [15] Panahzadeh F, Mirnasuri R, Rahmati M. Exercise and Syzygium aromaticum reverse memory deficits, apoptosis and mitochondrial dysfunction of the hippocampus in Alzheimer's disease [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 286: 114871. doi: 10.1016/j.jep.2021.114871.

The impact of mandibular retrognathism on memory and cognitive function in rats

Li Qingchun^{1,2}, Han Quancheng^{1,2}, Liu Xiaoyu^{1,2}, Wu Tingting^{1,2}

(¹ College & Hospital of Stomatology, Anhui Medical University,

² Key Lab. of Oral Diseases Research of Anhui Province, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the impact of mandibular retrognathism on brain function in rats and its potential mechanisms. **Methods** Male SD rats aged 3 to 4 weeks (w) were randomly divided into control group ($n = 10$) and mandible retrusion (MR) group ($n = 30$), with the MR group further divided into three subgroups: 1, 2, or 4 weeks, with 10 rats in each subgroup. The MR group used modified metal tubes, which were bonded to the lingual side of the maxillary incisors in rats, forcing the mandible to retract by 2–2.5 mm, thereby achieving the goal of constructing a mandibular retrognathism model; the control group received no interventions. The effects of mandibular retraction on the spatial learning ability and memory ability of rats were explored by behavioral experiments such as Morris water maze, Y maze and new object recognition 1, 2, and 4 weeks after modeling, respectively. Hematoxylin-eosin (HE) and Nissl staining were employed to observe the histomorphological changes in CA1, CA3, and DG regions of hippocampal tissues. Immunohistochemistry was employed to detect the protein expression levels of tropomyosin receptor kinase B (TrkB) in the CA1, CA3, and dentate gyrus (DG) regions of the hippocampus. Western blot was used to assess the expression changes in the TrkB/phosphoinositide 3-kinase (PI3K) / protein kinase B (AKT) pathway in hippocampal tissue. Quantitative analysis of apoptosis-related proteins in the hippocampus, including Bcl-2-associated X protein (Bax), B-cell lymphoma-2 protein (Bcl-2), and Caspase-3, was conducted using qRT-PCR and Western blot. **Results** Behavioral experiments showed that rats in the MR group, especially the MR 4 w group, were significantly weaker in learning and spatial memory than the control group, MR 1 w, and MR 2 w ($P < 0.05$). HE staining showed that pyramidal cells in the control group were arranged orderly with regular morphology. In contrast, the MR group exhibited a reduction in the number of cells in the hippocampal CA1, CA3, and dentate gyrus (DG) regions. The cells were sparsely and irregularly arranged, with nuclear condensation and enlarged cellular spaces. Nissl staining further demonstrated damage to the Nissl bodies in the MR group. Meanwhile, the TrkB/PI3K/AKT signaling pathway was activated in the MR group, and the expression of p-TrkB, PI3K, and p-AKT proteins was up-regulated ($P < 0.05$). Western blot and qRT-PCR indicated that MR up-regulated the expression of pro-apoptotic protein Bax, apoptotic effector protein Caspase-3 ($P < 0.05$), and inhibited the expression of anti-apoptotic protein Bcl-2 ($P < 0.05$). **Conclusion** Mandibular retraction impairs brain function and affects cognition and learning memory in rats. This may be achieved by regulating the TrkB/PI3K/AKT signaling pathway to induce apoptosis in hippocampal neurons.

Key words mandibular retrognathia; cerebral function; cognition; TrkB; PI3K/AKT; apoptosis

Fund programs Natural Science Research Project of Anhui Educational Committee (No. 2022AH050734); Discipline Construction "Fengyuan" Collaborative Projects of College & Hospital of Stomatology, Anhui Medical University (Nos. 2022xkfyts06, 2022xkfyhz03)

Corresponding author Wu Tingting, E-mail: wutingting_focus@163.com