

## 下颌后缩对大鼠脑血流及脑卒中恢复的影响

付春风,刘小郁,韩全成,郑秀云,梅勤,程雨荷,吴婷婷

(安徽医科大学口腔医学院,安徽医科大学附属口腔医院,安徽省口腔疾病研究重点实验室,合肥 230032)

**摘要** **目的** 探究下颌后缩对脑部血流的改变以及对脑卒中恢复产生的影响和潜在的机制。**方法** 6周龄的SD雄性大鼠选作实验对象。金属套管粘接于大鼠上颌切牙1周,迫使下颌后缩(MR)。通过激光散斑成像检测MR对脑部血流改变;莫里斯水迷宫检测MR对认知功能改变。而后通过大脑中动脉阻塞法(MCAO)对MR建造脑卒中模型(MCAO MR)观察1周。此外,将MCAO MR大鼠在制备MCAO当天去除金属套管,使其在自然状态下恢复下颌骨的位置,设为脑卒中+咬合恢复(MCAO RO)组并作为阳性对照。至此将大鼠分为Sham组、MCAO组、MCAO MR组、MCAO RO组。通过改良神经评分检测神经功能;2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染色检测大鼠大脑缺血面积;苏木精-伊红(HE)染色观察神经细胞变化;免疫组化检测血管内皮生长因子(VEGF)蛋白表达水平;Western blot检测血小板-内皮细胞黏附分子(CD31)、沉默调节蛋白6(SIRT6)、硫氧还蛋白互作蛋白(TXNIP)的蛋白表达水平,qRT-PCR检测SIRT6、TXNIP、VEGF的mRNA表达水平;免疫荧光检测小胶质细胞活化标志物离子钙结合衔接分子1(IBA-1)。**结果** 激光散斑显示下颌后缩使脑部血流出现降低,水迷宫显示认知功能下降。MCAO MR相较于其他组,TTC染色显示的缺血面积更大,HE染色和神经评分显示神经系统功能恢复更差。Western blot和qRT-PCR显示MCAO MR组抑制SIRT6的mRNA和蛋白表达水平,上调了TXNIP的mRNA和蛋白表达水平,小胶质细胞活化增多。**结论** 下颌后缩降低脑部血流改变大鼠认知功能,并调控SIRT6/TXNIP轴抑制脑卒中大鼠血流和神经恢复。

**关键词** 下颌后缩;脑血流;脑卒中;康复;认知功能

**中图分类号** R 783.9

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2024)10-1814-09

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.10.017

下颌后缩是常见的错颌畸形,中国青少年发病率约为10%~20%<sup>[1]</sup>,并对全身健康状况产生影

响。虽然下颌前伸对于脑血流的影响被证明<sup>[2]</sup>,但下颌后缩与脑血流关系的研究很少,可能是由于临床医生更关注下颌后缩对面部美观的影响,忽视了下颌后缩与脑部血流的关系。

同时下颌后缩会引起气道狭窄,血氧水平降低、血管变性等并发症,都是脑卒中的高危因素<sup>[3]</sup>。并且脑卒中发病率逐年上升,已成为中国第一大残率疾病<sup>[4]</sup>,因此脑卒中患者的康复备受关注。脑卒中康复过程复杂,受到多种因素影响。研究<sup>[5]</sup>指出脑

2024-06-27 接收

基金项目:安徽省高校科研计划项目(编号:2023AH050635);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:2022xkfyts06,2022xkfyhz03)

作者简介:付春风,男,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

sion treatment for 24 hours in all groups. Water-soluble tetrazolium salt-1 (WST-1) method was used to detect endothelial cell viability, caspase-3 enzyme activity was measured, and Western blot was used to detect the expression levels of zone occluden-1 (ZO-1) and claudin-5. **Results** After RIPC in healthy adults, plasma exosomes significantly increased the cell activity of HMEC-1 cells and decreased the activity of caspase-3 enzyme in HMEC-1 cells. **Conclusion** After RIPC treatment, plasma exosomes reduced endothelial cell apoptosis and increased endothelial cell hypoxia tolerance.

**Key words** remote ischemic preconditioning; exosome; endothelial cell; hypoxia tolerance; tight junction

**Fund programs** National Natural Science Foundation of China(No. 82060337); Medical and Health Science and Technology Plan Project of Longgang District, Shenzhen( Nos. LGKCYLWS2021000033, LGKCYLWS2023025); Scientific and Technological Plan Project of Shenzhen( Nos. JCYJ20220531092412028, JCYJ20230807121306012)

**Corresponding author** Shao Guo, E-mail: shao\_guo\_china@163.com

卒中的恢复与脑血流密切相关,下颌后缩又是一系列血管疾病的危险因素,与脑血流存在着关系。故脑卒中恢复过程可能会受到下颌后缩的影响。但目前还没有关于下颌与脑卒中恢复之间的研究。该研究是为了探索下颌后缩对于脑卒中恢复的影响,并阐明可能存在的潜在机制。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** SPF级雄性SD大鼠40只(6周龄,体质量200~210 g)购自苏州西山生物技术有限公司,在安徽医科大学动物实验中心饲养。所有大鼠在实验开始前1周放置于(22±4)℃下环境下饲养,湿度40%~60%,光/暗交替各12 h,且可自由获取水和食物。所有动物实验与操作均经安徽医科大学实验动物伦理委员会批准[实验动物使用许可证编号:SCXK(皖)2017-005,生产许可证编号:SCXK(苏)2022-0005,伦理批号:T2022003]。

**1.2 主要材料** 2%戊巴比妥钠由安徽医科大学实验中心提供;激光散斑血流仪购自英国Gene&I公司;水迷宫购自意大利Ugo Basileugo公司;TTC染色试剂盒购自美国Sigma公司;BCA蛋白测定试剂盒、苏木精-伊红(HE)染色试剂盒购自上海Beyotime生物公司;TRIzol购自美国Thermo Fisher SCIENTIFIC公司;Prime™ RT reagent KIT购自大连TaKaRa公司;FastStar Essential DNA Probes Master及实时荧光PCR探针购自美国Roche公司;PBS缓冲液、枸橼酸盐缓冲液购自北京中山金桥生物公司;DAB显色液购自上海Beyotime生物有限公司;兔抗大鼠SIRT6单克隆抗体购自成都ZENBIO生物有限公司;兔抗大鼠VEGF、TXNIP单克隆抗体购自杭州HUABIO生物有限公司;兔抗大鼠CD31单克隆抗体购自美国Abcam公司;HRP标记的山羊抗兔二抗β-actin购自武汉三鹰生物技术有限公司;电泳仪、转膜仪、凝胶成像系统购自美国Bio-Rad公司。

## 1.3 实验方法

**1.3.1 分组和模型制备** 40只雄性大鼠随机平均分为四组:假手术组(Sham组)、脑卒中组(MCAO组)、脑卒中+下颌后缩组(MCAO MR组)、脑卒中+恢复咬合组(MCAO RO组)。在MCAO MR组和MCAO RO组大鼠上切牙粘接金属套管使其下颌后退,检测正常大鼠和下颌后缩大鼠固定装置后脑部血流在第0、1、3、7天的变化,以及第7天认知功能

的变化。随后在MCAO、MCAO MR、MCAO RO组按照大脑中动脉阻塞法建造脑卒中模型,方法如下:用2%的戊巴比妥钠麻醉大鼠,分离并结扎颈外动脉,同时暂时性结扎颈总动脉,将颈内动脉进行分离,剪断颈外动脉,从颈外动脉靠结扎线的远端做切口,插入尼龙线使其经过颈总动脉分叉进入颈内动脉,阻断邻近的大脑中动脉所有血供,90 min后缓缓拔出栓线。MCAO RO作为阳性对照组,去除金属套管,恢复其正常下颌位置。脑卒中模型建立1周后,处死所有大鼠,取材进行实验。

**1.3.2 激光散斑检测** 麻醉大鼠固定于脑定位仪上,为清晰显示脑血流量和血管形态,采用左侧手术入路,打磨机打薄颅骨,激光定位检测右侧固定点脑部血流,充分消毒后缝合。粘接金属套管后1、3、7 d重复上述操作检查脑部血流。

**1.3.3 莫里斯水迷宫** 圆形水池分为四个象限,在其中一块区域设立一水下平台(第五象限),训练阶段:每只大鼠每天从不同象限进入水池,强迫其游泳找到水下平台,60 s内找不到平台的大鼠引导其至平台,并停留10 s,连续按上述方法训练4 d。实验阶段:撤去水下平台,大鼠从第一象限放入,记录大鼠游泳的轨迹图,第一次找到第五象限的时间(潜伏期)和在第五象限停留的时间<sup>[6]</sup>。

**1.3.4 改良神经评分法** 脑卒中模型建造1周后,为评价各组神经功能的恢复状况,采用改良神经评分。评分范围从0(无神经功能缺损)~18(最严重)分,根据大鼠在的表现进行打分,检测方法如下所示:①运动实验:大鼠提尾、行走实验的表现;②感官测试:大鼠视觉、触觉以及本体感受器的状况;③平衡测试:平衡木上滞留时间;④反射测试:对环境变化作出的反应。

**1.3.5 组织样本处理和收集** 脑卒中模型1周进行组织取材,腹腔注射麻醉大鼠,灌注4%多聚甲醛,直至流出的液体清亮为止。在冰上解剖获取脑组织,放入多聚甲醛固定,石蜡包埋组织,用切片机制成5 μm的冠状厚切片,用于组织学分析。部分组织仅用生理盐水灌注,放入-80℃冰箱保存,以便后期蛋白质和mRNA测定分析。

**1.3.6 TTC染色** 2%戊巴比妥钠腹腔过量麻醉大鼠致死,断颈取脑放入-20℃,变硬后切脑模具将大脑切成5片脑切片,放入TTC染色液,36℃孵育15 min取出,翻至另一面继续36℃孵育15 min。取

出脑切片,置入4%多聚甲醛过夜拍照。

**1.3.7 HE染色** 经过脱蜡、保湿,依次放入苏木精染色5 min,流水冲洗2 min,盐酸乙醇分化30 s,流水冲洗1 min,碳酸锂蓝化30 s,流水冲洗1 min,伊红染色3 s。梯度乙醇脱水,二甲苯透明后,中性树胶封片,在显微镜下观察并采集图片。

**1.3.8 qRT-PCR检测** -80℃冰箱取出脑组织,使用TRIzol提取RNA,逆转录体系成cDNA进行PCR反应,采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算基因的相对表达量,引物由上海生工生物有限公司合成。 $\beta$ -actin上游引物5'-CAAGTTCAACGGCACAGTCAAGG-3',下游引物3'-ACATACTCAGCACCAGCATCACC-5',VEGF上游引物5'-TGGCTACGTGGATGAGGTGATG-3',下游引物3'-CGGTGGCAGGGCTTTCTCTAG-5',SIRT6上游引物5'-CAACGGCACAGTGGTGGATGAG-3',下游引物3'-AGGGCTTTCTCTAGGGTGGTC-5',TXNIP上游引物5'-TCAACGGCACAGTCAAGGGCAC,下游引物3'-GGCAGGGCTTTCTCTAGGGTG-5'。

**1.3.9 蛋白印记实验** -80℃冰箱取出脑组织,加入RIPA研磨裂解提取总蛋白质,BCA试剂盒测定蛋白浓度,蛋白质样品用总体积1/5的蛋白缓冲液。将蛋白经SDS-PAGE电泳分离后,转移到聚偏氟乙烯(PVDF)膜上。5%脱脂牛奶封闭2 h,TBST溶液5 min×5次摇床上冲洗,各分子条带放入VEGF(1:1 000)、SIRT6(1:2 000)、TXNIP(1:1 000)、 $\beta$ -actin(1:10 000)一抗中4℃过夜孵育12 h。次日,将膜与HRP结合山羊抗兔IgG二抗(1:50 000)在室温下孵育1 h。使用ECL发光底物以及Bio-Rad成像系统检测蛋白条带,Image J测量各蛋白灰度值。

**1.3.10 免疫组化实验** 切片二甲苯脱蜡,乙醇梯度递减使切片水化。高温枸橼酸钠溶液抗原修复10 min,冷却至室温进行抗原修复。免疫组化笔样本周围1 mm画圈固定样本。3%过氧化氢室温下避光阻断15 min,滴加5%浓度的山羊血清封闭30 min。孵育VEGF(1:500)一抗工作液过夜,第2天取出室温复温1 h后清洗。孵育山羊抗兔二抗(1:1 000)1 h。DAB显色法加入工作液5 s,清洗后镜下观察。苏木精染色3 min,冲洗2 min,盐酸乙醇分化30 s,冲洗1 min,碳酸锂蓝化30 s,梯度乙醇脱水,二甲苯透明后,用中性树胶封片。

**1.3.11 免疫荧光实验** 切片60℃烘片1 h,二甲

苯脱蜡,用5%山羊血清封闭。滴加IBA-1一抗(1:1 000)工作液过夜孵育。第2天室温复温1 h,滴加iFluoroTM488山羊抗兔荧光二抗(1:200)工作液,避光孵育1 h。滴加DAPI工作液孵育10 min,清洗后加入荧光淬灭剂。正置荧光显微镜下观察拍照。

**1.4 统计学处理** 采用GraphPad Prism 10.0软件分析处理实验数据。所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 $t$ 检验,多组间的比较用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 大鼠下颌产生后缩对脑部血流和认知功能的影响** 上下颌切牙之间水平距离为1 mm,安装下颌后缩装置1周后变为3 mm,大鼠下颌的位置向后移动了大约2 mm。激光散斑检测脑部血流在装置安装后随时间点的变化。与Sham组( $197.40 \pm 46.17$ )相比,MR组( $1028.00 \pm 33.89$ )脑部血流在第3天出现下降( $t = 6.13, P < 0.05$ ),第7天出现更加明显的下降,差异有统计学意义( $t = 7.79, P < 0.01$ )。莫里斯水迷宫检测下颌后缩1周后,认知功能的变化。Sham组呈直线式且与寻找第五象限相比,MR组寻找平台的轨迹图为随机式,并且MR组的潜伏期更长( $t = 13.40, P < 0.05$ ),在第五象限停留的时间更短,差异有统计学意义( $t = 7.04, P < 0.05$ )。提示MR组大鼠的探索认知功能受到破坏。见图1。

**2.2 下颌后缩对脑卒中大鼠脑缺血面积产生影响** TTC染色观察脑缺血面积的大小,Image J分析梗死区域占总脑面积的百分比。与Sham组( $4.50 \pm 1.80$ )相比,MCAO组( $55.34 \pm 3.09$ )明显有大面积的梗死,且差异有统计学意义( $F = 1008.25, P < 0.05$ )。与MCAO组相比,MCAO MR组( $76.38 \pm 3.15$ )缺血梗死的面积更大,差异有统计学意义( $F = 113.27, P < 0.05$ )。而下颌在恢复自然位置后,MCAO RO组( $58.79 \pm 1.82$ )相比于MCAO MR缺血面积减少。表明去除下颌后缩,有利于改善脑部缺血状况。见图2。

**2.3 下颌后缩对脑卒中大鼠神经功能恢复产生影响** HE染色观察神经细胞形态,Sham组细胞形态结构正常,MCAO组神经细胞出现空泡样变性,MCAO MR组出现大量神经细胞空泡样变性和细胞

皱缩,细胞内部结构完全崩解,形成空泡样物质。改良神经评分判断神经功能恢复,结果显示 MCAO 组

( $7.16 \pm 1.16$ ) 较 Sham 组 ( $1.00 \pm 0.89$ ) 出现明显的神经功能损伤,且差异有统计学意义 ( $F = 105.30$ ,

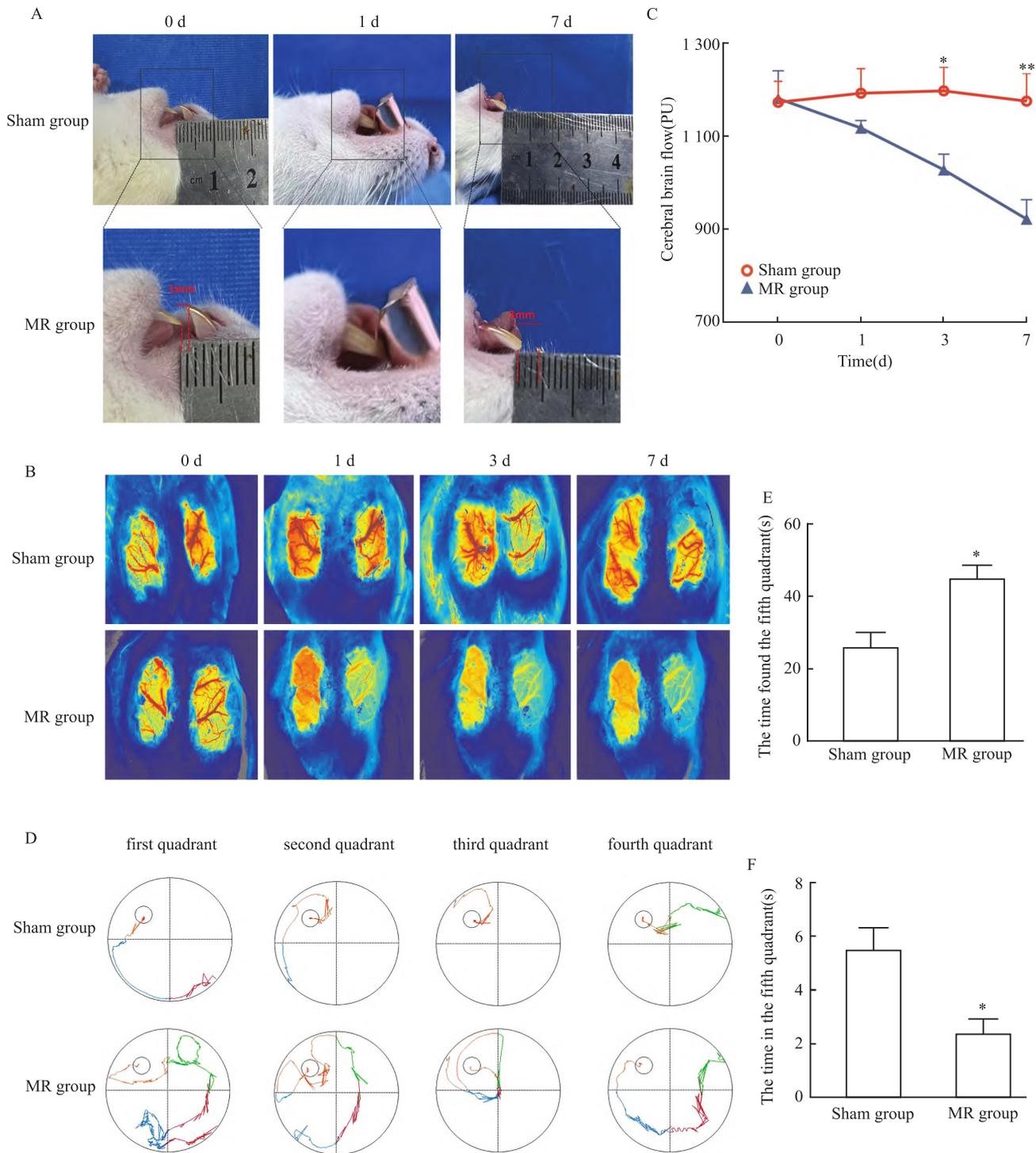


图 1 大鼠下颌后缩降低了脑部血流和认知功能

Fig.1 Mandibular retrusion in rats reduced cerebral blood flow and cognitive function

A: Schematic diagram of mandibular retrusion in rats; B: Laser speckle cerebral blood flow imaging; C: Numerical analysis of the cerebral blood flow rate; D: The water maze trajectory diagram; E: Numerical analysis of the incubation period; F: Numerical analysis of the residence time in the fifth quadrant; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs Sham group.

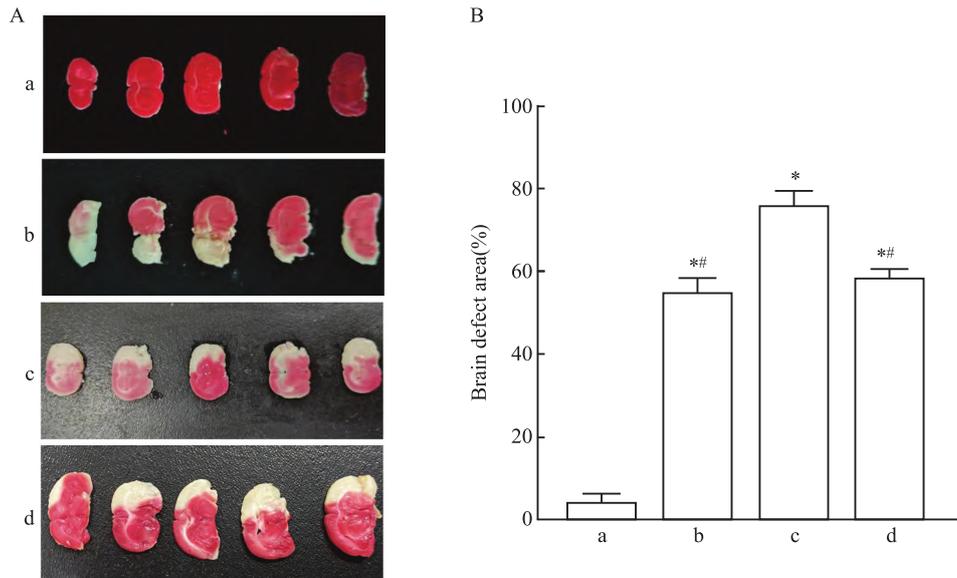


图2 下颌后缩对脑缺血面积影响

Fig.2 Effect of posterior mandibular retrusion on cerebral ischemic area

A: Schematic representation of cerebral ischemia after TTC staining 7 days after stroke; B: Numerical analysis of the cerebral ischemic area; a: Sham group; b: MCAO group; c: MCAO MR group; d: MCAO RO group; \*  $P < 0.05$  vs Sham group; #  $P < 0.05$  vs MCAO MR group.

$P < 0.05$ )。而 MCAO MR 组 ( $15.16 \pm 1.16$ ) 的评分显著高于 MCAO 组, 神经功能恢复受到明显抑制 ( $F = 140.48$ ,  $P < 0.05$ )。MCAO RO 组 ( $6.00 \pm 0.89$ ) 比 MCAO MR 的评分低, 且差异有统计学意义 ( $F = 232.08$ ,  $P < 0.05$ )。qRT-PCR 检测了炎症因子 IL-6 的 mRNA 表达量, 结果显示 MCAO MR 组 ( $42.74 \pm 1.12$ ) 炎症水平显著高于 MCAO 组 ( $7.92 \pm 0.59$ ), MCAO RO 组 IL-6 的表达较 MCAO 组 ( $15.76 \pm 0.15$ ) 下降, 且差异有统计学意义 ( $F = 1700.53$ ,  $P < 0.05$ )。见图 3。

**2.4 下颌后缩影响 VEGF 的表达** 免疫组化检测 VEGF 的蛋白表达水平, Image J 进行阳性表达区域分析。与 Sham 组 ( $74.42 \pm 3.44$ ) 相比, MCAO 组 ( $45.32 \pm 4.37$ ) 的蛋白表达显著减少 ( $F = 136.56$ ,  $P < 0.05$ )。相较于 MCAO 组, MCAO MR 组 ( $15.18 \pm 3.53$ ) 中 VEGF 的表达减少, 且差异有统计学意义 ( $F = 2271.04$ ,  $P < 0.05$ )。MCAO RO 组 ( $33.32 \pm 3.92$ ) 较 MCAO MR 组蛋白的表达量出现一定的上升 ( $F = 822.64$ ,  $P < 0.05$ )。qRT-PCR 对 VEGF 的 mRNA 表达进行分析, 结果显示出与蛋白表达量完全相同的趋势。见图 4。

### 2.5 下颌后缩调控脑卒中大鼠 SIRT6/TXNIP 轴

Western blot 结果显示 SIRT6 在 MCAO 组 ( $1.48 \pm 0.03$ ) 的表达相比 Sham 组 ( $1.01 \pm 0.03$ ) 升高, 但是

MCAO MR 组 ( $0.33 \pm 0.04$ ) 却明显降低, 下颌后缩对 SIRT6 表达有抑制作用 ( $F = 1131.03$ ,  $P < 0.01$ )。TXNIP 作为 SIRT6 的下游因子, 与 SIRT6 的趋势完全相反。相比于 Sham 组 ( $1.01 \pm 0.03$ ), TXNIP 的表达在 MCAO 组 ( $0.57 \pm 0.03$ ) 降低, 而在 MCAO MR 组 ( $1.42 \pm 0.04$ ) 显著增高。同时 TXNIP 表达在 MCAO RO 组 ( $0.64 \pm 0.04$ ) 较 MCAO MR 组出现了下降, 差异有统计学意义 ( $F = 490.39$ ,  $P < 0.01$ )。CD31 是成血管的关键生长因子可作为脑卒中恢复的正向指标之一。结果显示 CD31 的表达水平在 MCAO MR 组 ( $0.38 \pm 0.07$ ) 显著降低, MCAO RO 组 ( $1.37 \pm 0.06$ ) 表达水平较 MCAO MR 组增高, 且差异有统计学意义 ( $F = 330.89$ ,  $P < 0.01$ )。最后, 用 qRT-PCR 检测 mRNA 的相对表达。SIRT6 的 mRNA 表达情况显示出与蛋白表达相同的趋势, 且 MCAO MR 组 ( $0.36 \pm 0.08$ ) 低于其他组, MCAO RO 组 ( $4.82 \pm 0.21$ ) 的表达量有所增加。TXNIP 的 mRNA 相对表达, MCAO MR 组 ( $6.92 \pm 0.43$ ) 最高, MCAO 组 ( $1.31 \pm 0.22$ ) 与 Sham 组 ( $1.02 \pm 0.03$ ) 的表达却无差异, 差异无统计学意义 ( $F = 5.65$ ,  $P > 0.05$ )。见图 5。

### 2.6 下颌后缩影响小胶质细胞活化

小胶质细胞活化受 SIRT6/TXNIP 轴调控, 其活化后抑制血管生成。该研究通过免疫荧光检测小胶质细胞活化标志

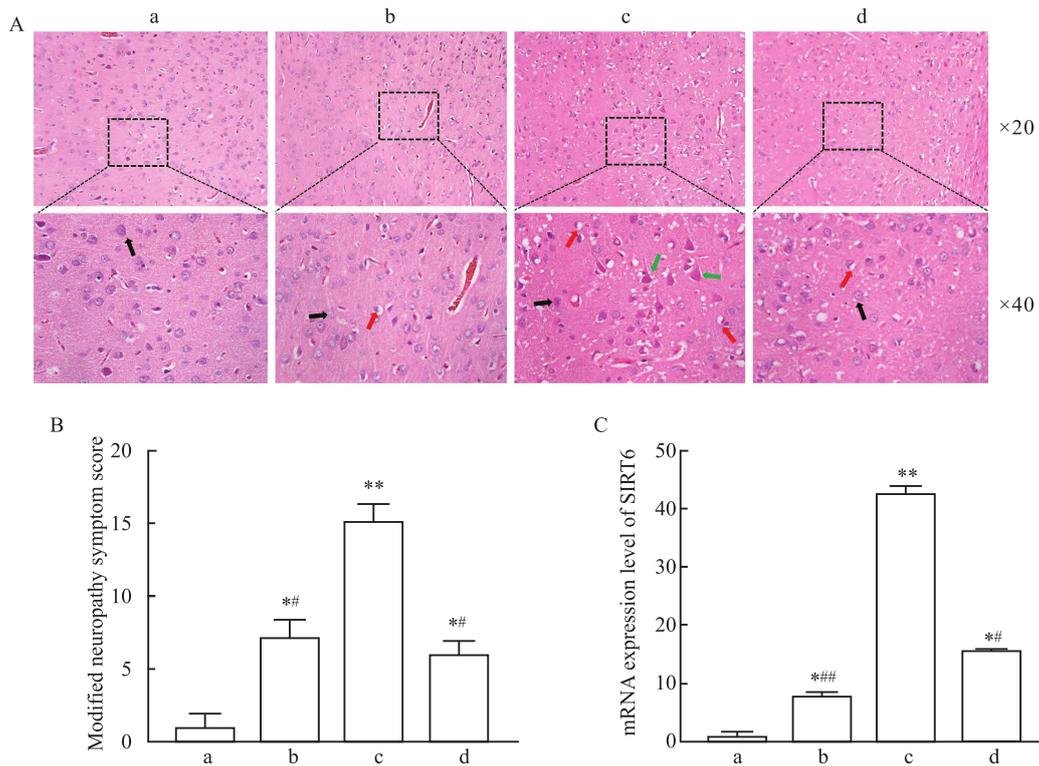


图3 下颌后缩抑制神经功能恢复

Fig.3 Mandibular retrusion inhibits neurological recovery

A: The HE staining results are shown in figure, black arrow: normal nerve cells, red arrow: vacuolar-like denured cells, green arrow: a cell with wrinkled nuclei; B: Numerical analysis of the modified neuropathy symptom score; C: Numerical analysis of the mRNA expression levels of IL-6; a: Sham group; b: MCAO group; c: MCAO MR group; d: MCAO RO group; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs Sham group; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  vs MCAO MR group.

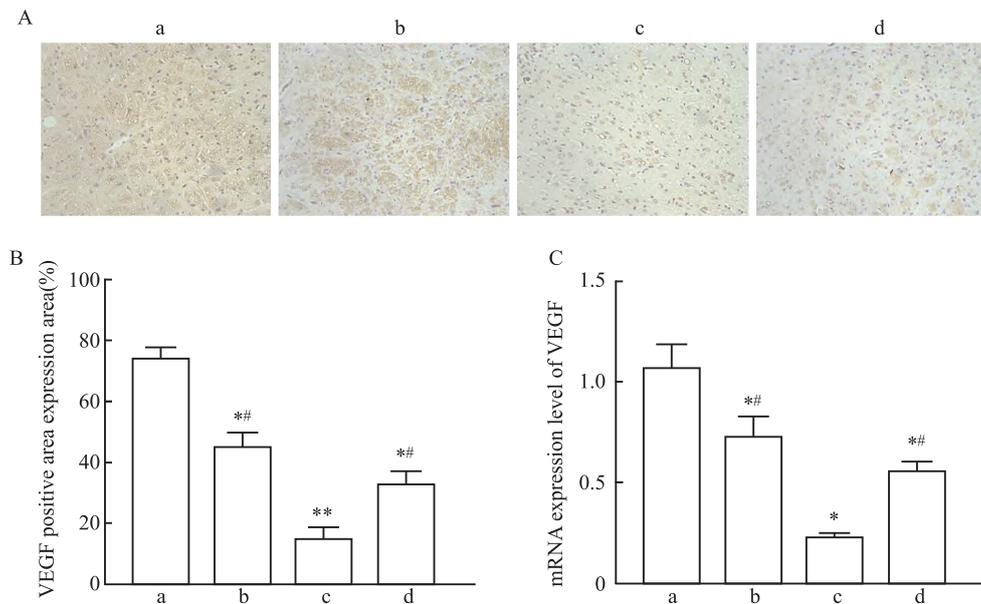


图4 下颌后缩降低 VEGF 的表达

Fig.4 Mandibular retrusion decreases the expression of VEGF

A: The VEGF protein expression levels were determined by immunohistochemistry  $\times 20$ ; B: Numerical analysis of regions with positive VEGF expression; C: Numerical analysis mRNA expression of VEGF; a: Sham group; b: MCAO group; c: MCAO MR group; d: MCAO RO group; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs Sham group; #  $P < 0.05$  vs MCAO MR group.

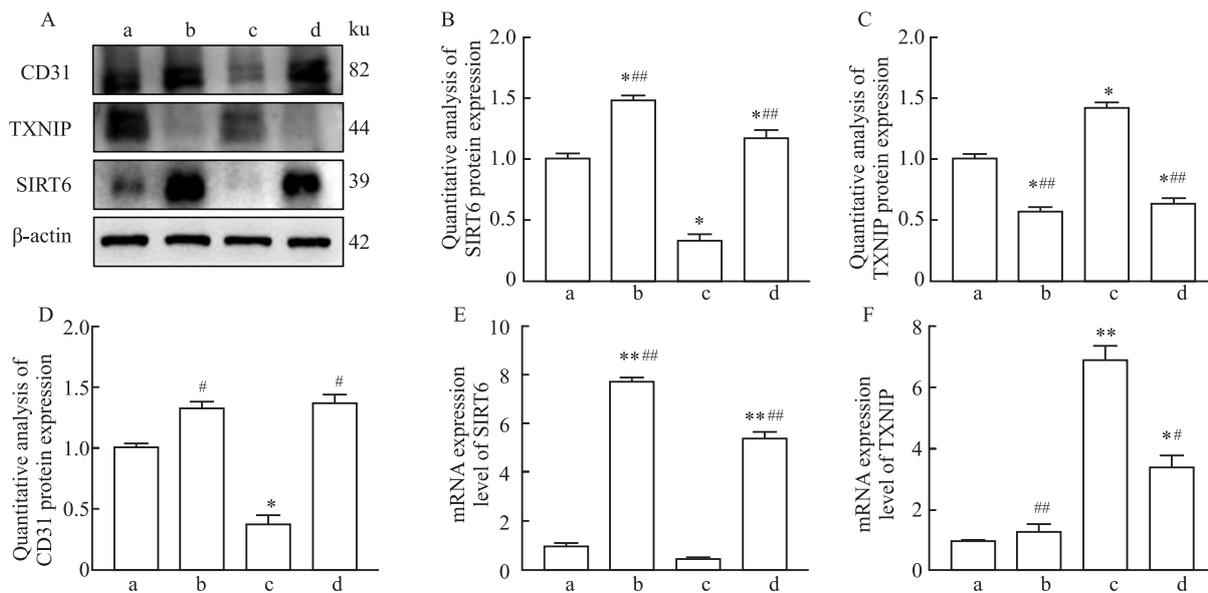


图5 下颌后缩调控 SIRT6/TXNIP 的表达

Fig.5 Mandibular retrusion regulates the expression of SIRT6/TXNIP

A: Protein development bands for CD31, SIRT6, and TXNIP; B: Quantitative protein expression of SIRT6; C: Quantitative protein expression of TXNIP; D: Quantitative protein expression of CD31; E: Relative mRNA expression levels of SIRT6; F: Relative mRNA expression levels of TXNIP; a: Sham group; b: MCAO group; c: MCAO MR group; d: MCAO RO group; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs Sham group; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  vs MCAO MR group.

物 IBA-1 的表达情况,绿色荧光表达越强,说明 IBA-1 表达量越高和小胶质细胞活化越多。结果显示, Sham 组几乎没有绿色荧光的表达,小胶质细胞无活化。MCAO MR 组绿色荧光表达最强,小胶质细胞活化最多。MCAO 与 MCAO RO 两组之间无明显差异,较 MCAO MR 组降低。上述结果表明下颌后缩增加脑卒中大鼠小胶质细胞的活化,可能抑制脑卒中大鼠脑部血流的恢复。见图 6。

### 3 讨论

下颌后缩是颅颌面结构异常中的常见情况。病因多样,包括遗传、内分泌失调、不良习惯及外伤等<sup>[7]</sup>。研究<sup>[2]</sup>显示,下颌前伸可能通过咀嚼神经刺激,改变脑部血流和活动。但是根据研究<sup>[8]</sup>表明,下颌后缩的咀嚼效率事实上更加低效,可其对脑部的影响却鲜少被关注。随着非侵入性检测仪器的发明和进步,观察脑血流和功能的变化更加方便,尤其是激光散斑的出现,能够提供实时的脑部血流数据和监测。因此,该研究在大鼠身上模拟了临床上下颌后缩的表现,通过激光散斑和行为学实验的方法,发现了下颌后缩可以使脑血流减少和认知能力下降。然而,下颌后缩的成因众多,该实验所模拟的仅是下颌后缩的状态,而关于不同病因和发育阶段可

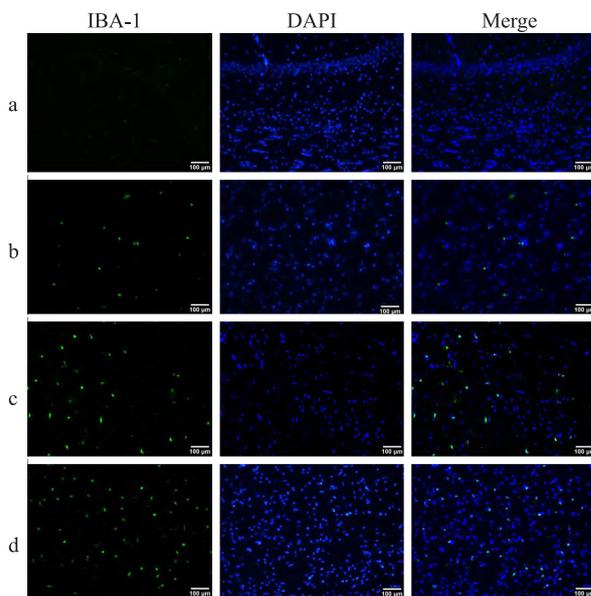


图6 大鼠脑梗死组织周围 IBA-1 免疫荧光染色图 ×40

Fig.6 Immunofluorescence staining plots of IBA-1 around rat cerebral infarcted tissue ×40

a: Sham group; b: MCAO group; c: MCAO MR group; d: MCAO RO group; Green fluorescence: immunofluorescence staining of IBA-1; Blue fluorescence: immunofluorescence staining of DAPI, scale bar = 100 μm.

能带来的差异影响还未进行探究。例如下颌后缩的病因中有遗传因素导致,受基因水平的调控。IGF、

KAT6B、GHR 等基因都被认为与下颌后缩的形成相关,这些基因对于该实验的影响可能不尽相同,值得进一步研究。

此外,下颌后缩与呼吸道阻塞紧密相关。研究<sup>[9]</sup>表明,下颌后缩增加睡眠呼吸暂停综合征的风险,后者又与心血管疾病紧密相连。有报道颌面部结构异常可能通过改变呼吸模式和血液循环,间接影响脑血流<sup>[10]</sup>。下颌后缩是颌面结构中常见的一种异常疾病,脑卒中的康复与脑血流量和微血管的建立密切相关<sup>[11]</sup>。结合以上背景,下颌后缩与脑卒中之间的恢复存在着潜在的联系。通过该研究表明,下颌后缩抑制脑卒中后的血流恢复和神经功能,增大了梗死面积,导致神经功能下降。但由于种属间差异,这一发现能否应用于临床需要通过流行病学研究进一步验证。

近年来,SIRT6 作为脑卒中恢复的关键调控因子备受关注。它与 TXNIP 相互作用,形成一个关键轴心,影响炎症反应和血管生成,进而控制脑血流和组织恢复<sup>[12]</sup>。下颌后缩会通过影响咀嚼效率和食物摄入量,进而影响能量平衡和代谢<sup>[13]</sup>。SIRT6 在调节能量代谢中起关键作用<sup>[14]</sup>,可能会因为下颌后缩引起的代谢改变而受到影响。SIRT6/TXNIP 轴调控小胶质细胞活化对于成血管的重要作用已被证实,小胶质细胞的活化提高大脑内炎症水平,降低 VEGF 和 CD31 等成血管关键因子表达<sup>[15]</sup>。该研究表明下颌后缩通过调控 SIRT6/TXNIP 轴,小胶质细胞活化增多,抑制 VEGF 和 CD31 等血管生成关键因子,从而降低脑卒中大鼠的脑血流和神经恢复,为下颌后缩与脑卒中恢复之间的联系提供了新的理解。但由于该研究实验观察时间均较短,今后需在较长时间内观察各项指标的表达情况及与下颌后缩(伴有或不伴有脑卒中)的联系,这也是该研究的实验局限性之一。

综上所述,下颌后缩不仅影响咀嚼效率,还可能抑制脑血流和神经功能,尤其在脑卒中恢复过程中发挥负面作用。这些发现对于理解下颌后缩与脑部疾病的关系,以及为治疗提供新的思路具有重要意义。

### 参考文献

- [1] 嵇潇雷,曹 灵. 肌功能训练在安氏 II 类 1 分类下颌后缩矫正中的临床疗效分析[J]. 口腔生物医学, 2019, 10(4): 205-8. doi:10.3969/j.issn.1674-8603.2019.04.008.
- [1] Ji X L, Cao L. Muscle function training in Class II division I

- mandibular retraction correction in the clinical curative effect[J]. Oral Biomed, 2019, 10(4): 205-8. doi:10.3969/j.issn.1674-8603.2019.04.008.
- [2] 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.
- [3] Xiang M, Hu B, Liu Y, et al. Changes in airway dimensions following functional appliances in growing patients with skeletal class II malocclusion: a systematic review and meta-analysis[J]. Int J Pediatr Otorhinolaryngol, 2017, 97: 170-80. doi:10.1016/j.ijporl.2017.04.009.
- [4] 《中国脑卒中防治报告 2019》编写组. 《中国脑卒中防治报告 2019》概要[J]. 中国脑血管病杂志, 2020, 17(5): 272-81. doi:10.3969/j.issn.1672-5921.2020.05.008.
- [4] Compilation team for 《Chinese Stroke Prevention and Control Report 2019》. Brief report on stroke prevention and treatment in China, 2019[J]. Chin J Cerebrovasc Dis, 2020, 17(5): 272-81. doi:10.3969/j.issn.1672-5921.2020.05.008.
- [5] Wardlaw J M, Murray V, Berge E, et al. Thrombolysis for acute ischaemic stroke[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2014, 2014(7): CD000213. doi:10.1002/14651858.CD000213.pub3.
- [6] Schoenfeld R, Schiffelholz T, Beyer C, et al. Variants of the Morris water maze task to comparatively assess human and rodent place navigation[J]. Neurobiol Learn Mem, 2017, 139: 117-27. doi:10.1016/j.nlm.2016.12.022.
- [7] George A M, Felicita A S, Milling Tania S D, et al. Systematic review on the genetic factors associated with skeletal Class II malocclusion[J]. Indian J Dent Res, 2021, 32(3): 399-406. doi:10.4103/ijdr.IJDR\_59\_20.
- [8] Hamdi A, Kallala R, Harzallah B. Chewing efficiency and contact area discrepancies in angle's class I and II malocclusion: a comparative study[J]. Saudi Dent J, 2024, 36(4): 633-7. doi:10.1016/j.sdentj.2023.12.016.
- [9] Nath M, Ahmed J, Ongole R, et al. CBCT analysis of pharyngeal airway volume and comparison of airway volume among patients with skeletal class I, class II, and class III malocclusion: a retrospective study[J]. Cranio, 2021, 39(5): 379-90. doi:10.1080/08869634.2019.1652993.
- [10] Teh C S, Mah M C, Rahmat K, et al. Neuroimaging systematic review in persistent postural-perceptual dizziness: the elaborate alterations in the delicate network to remain balanced[J]. Otol Neurotol, 2022, 43(1): 12-22. doi:10.1097/MAO.00000000000003389.
- [11] Gregorius J, Wang C, Stambouli O, et al. Small extracellular vesicles obtained from hypoxic mesenchymal stromal cells have unique characteristics that promote cerebral angiogenesis, brain remodeling and neurological recovery after focal cerebral ischemia in mice[J]. Basic Res Cardiol, 2021, 116(1): 40. doi:10.1007/s00395-021-00881-9.

- [12] Hara Y. Brain plasticity and rehabilitation in stroke patients[J]. *J Nippon Med Sch*, 2015, 82(1): 4-13. doi:10.1272/jnms.82.4.
- [13] Yilihamu S, Li Y, Nueraihemaiti Z, et al. Comparison study of chewing efficiency in patients with different vertical skeletal patterns of angle class I and angle class II malocclusions[J]. *Quintessence Int*, 2024, 55(3): 224-30. doi:10.3290/j.qi.b4867859.
- [14] Roichman A, Elhanati S, Aon M A, et al. Restoration of energy homeostasis by SIRT6 extends healthy lifespan[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 3208. doi:10.1038/s41467-021-23545-7.
- [15] Wang J, Wang X J, Zhang Y, et al. TXNIP knockout improves cardiac function after myocardial infarction by promoting angiogenesis and reducing cardiomyocyte apoptosis[J]. *Cardiovasc Diagn Ther*, 2022, 12(3): 289-304. doi:10.21037/cdt-21-732.

## The effect of mandibular retrusion on cerebral blood flow and stroke recovery in rats

Fu Chunfeng, Liu Xiaoyu, Han Quancheng, Zheng Xiuyun, Mei Qin, Cheng Yuhe, Wu Tingting  
(College & Hospital of Stomatology, Anhui Medical University,  
Key Lab of Oral Disease Research of Anhui Province, Hefei 230032)

**Abstract Objective** To explore the changes in cerebral blood flow caused by mandibular retrusion, as well as the impact and potential mechanisms on stroke recovery. **Methods** 6-week-old SD male rats were selected as experimental subjects. The metal cannula was bonded to the rat maxillary incisor for one week, forcing mandibular retrusion (MR). Cerebral blood flow was detected by laser speckle imaging. Cognitive function was detected by the Morris water. Then, the stroke model was constructed in MR rats by using the middle cerebral artery occlusion (MCAO) method for one week. Meanwhile, metal cannulae were then removed in rats to restore the lower jaw's position (MCAO RO), serving as a positive control group. Consequently, rats were randomly divided into the following groups: Sham groups, MCAO groups, MCAO MR groups, and MCAO RO groups. Neurological recovery was assessed through the modified neurological severity score (mNSS). The area of cerebral infarction was evaluated by using triphenyltetrazolium (TTC) staining. The changes in nerve cells were observed by using hematoxylin eosin (HE) staining. The protein expression level of vascular endothelial growth factor (VEGF) was detected by immunohistochemistry. The protein expression levels of platelet-endothelial cell adhesion molecule (CD31), sirtuin 6 (SIRT6), and thioredoxin interaction protein (TXNIP) were detected by Western blot. The mRNA expression levels of SIRT6, TXNIP, and VEGF were determined by qRT-PCR. Microglia activation marker molecule 1 (IBA-1) was detected by immunofluorescence. **Results** Because of mandibular retrusion, laser speckle showed decreased cerebral blood flow, and the water maze showed decreased cognitive function. Compared to other groups, MCAO MR showed a larger ischemic area in TTC staining, while HE staining and neurological scoring showed poorer neurological function recovery. Western blot and qRT-PCR showed that the MCAO MR group inhibited the mRNA and protein expression levels of SIRT6, upregulated the mRNA and protein expression levels of TXNIP, and increased the activation of microglia. **Conclusion** Mandibular retrusion reduces cerebral blood flow and alters cognitive function in rats. Mandibular retrusion inhibits recovery in stroke through the SIRT6/TXNIP axis.

**Key words** mandibular retrusion; cerebral blood flow; stroke; recovery; cognitive

**Fund programs** Scientific Research Project of Universities of Anhui Province (No. 2023AH050635); 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