

硝酸盐通过调控 EGFR-AKT/ERK1/2 信号通路预防咬肌萎缩

刘 围^{1,2,3}, 刘小郁^{1,2,3}, 吴婷婷^{1,2,3}

(¹ 安徽医科大学口腔医学院, 合肥 230032; ² 安徽医科大学附属口腔医院, 合肥 230032;
³ 安徽省口腔疾病研究重点实验室, 合肥 230032)

摘要 **目的** 探究施加过载荷拉力后, 骀位变化对咬肌萎缩的影响以及预防性补充硝酸盐在防治咬肌萎缩中的作用及机制。**方法** 8 周龄的 SD 雄性大鼠被选作实验对象。将过载荷拉力装置置于大鼠口腔中获取大鼠骀位变化模型, 加力后不同时间点通过咬肌称重、咬肌组织 HE 染色以及对萎缩因子(MAFbx 和 MuRF1)的 Western blot 和免疫组化检测咬肌萎缩状态, 通过对 HIF-1 α 的免疫荧光染色检测咬肌缺氧状态, 通过血小板-内皮细胞黏附分子(CD31)的免疫荧光和血管内皮生长因子(VEGF)的免疫组化染色检测血管生成状况。预防性补充硝酸盐并加力 28 d 后, 通过上述方法检测咬肌萎缩、组织缺氧以及血管生成状况, Western blot 检测表皮生长因子受体(EGFR)、蛋白激酶 B(AKT)、细胞外信号调节激酶 1/2(ERK1/2)蛋白及其对应磷酸化蛋白表达水平, 并通过一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(绿色荧光)检测咬肌细胞凋亡情况。**结果** 大鼠过载荷拉力带来的骀位变化可导致咬肌萎缩并伴随咬肌组织内缺氧及血管生成标志蛋白表达降低; 预防性补充硝酸盐可预防咬肌萎缩、解除咬肌组织内缺氧状态并促进血管新生; 机制上, 硝酸盐通过激活 EGFR-AKT/ERK1/2 信号通路发挥抗细胞凋亡作用, 从而参与预防咬肌萎缩的过程。**结论** 鼠过载荷拉力带来的骀位变化可能导致咬肌萎缩, 而预防性补充硝酸盐可通过 EGFR-AKT/ERK1/2 信号通路介导的抗细胞凋亡作用来促进血管生成并缓解咬肌组织缺氧及萎缩。

关键词 骀位变化; 咬肌萎缩; 硝酸盐; 低氧; 血管生成; 凋亡

中图分类号 R 783.5

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)08-1401-09

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.08.006

咀嚼肌萎缩是骨骼肌萎缩的一种特殊形式, 会严重损害口腔功能, 咀嚼功能和整体生活质量^[1]。然而, 咀嚼肌萎缩的潜在机制仍未充分阐明, 预防和管理的研究也很少。有证据^[2]表明硝酸盐代谢与骨骼肌健康之间存在生理关联^[3-4]。因此, 硝酸盐在肌肉疾病, 尤其是咀嚼肌萎缩中的作用, 值得进一步研究。该研究验证了正畸过载牵引力是否会导致咬肌萎缩, 并通过此咬肌萎缩模型进一步探讨硝酸盐在预防咬肌萎缩中的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 45 只 SPF 级 7 周龄雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠, 体质量(250 $\pm$ 20) g, 在安徽

医科大学动物实验中心购买和饲养。所有大鼠在实验开始前 1 周置于(22 $\pm$ 4) $^{\circ}$ C 左右环境下饲养, 湿度控制在 40% ~ 60%, 光/暗周期各 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 2022(皖)-004, 伦理批号: LLSC20242526]。

1.1.2 试剂 2% 戊巴比妥钠和硝酸钠由安徽医科大学实验中心提供; BCA 蛋白测定试剂盒(货号 P0012)、苏木精-伊红(HE)染色试剂盒(货号 C0105S)、含 DAPI 的抗荧光淬灭封片液(货号 P0131)、一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(货号: C1088)购自上海碧云天生物科技有限公司; PBS 缓冲液(货号 ZLI-9061)、柠檬酸盐缓冲液(货号 ZLI-9064)购自北京中山金桥生物技术有限公司; 山羊血清(货号 BL1097A)购自北京兰杰柯科技有限公司; PAGE 凝胶快速制备试剂盒(货号 PG112)购自上海雅酶生物医药科技有限公司; 聚偏氟乙烯(PVDF)膜(货号 IPVH00010)购自美国 Millipore 公司; 肌肉特异性 RING 指蛋白(muscle specific RING finger protein, MuRF1)(货号 sc-398608)和肌肉萎缩盒蛋白(muscle atrophy F-box, MAFbx)(货号 sc-

2025-01-10 接收

基金项目: 安徽省高校科研项目(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: 2022xkfyts06, 2022 xkfyts03)

作者简介: 刘 围, 男, 硕士研究生;

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

166806)购自美国 Santa Cruz 公司;缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor 1-alpha, HIF-1 α) (货号 ab179483)、p-AKT (货号 ab38449)、AKT (货号 ab81283)购自美国 Abcam 公司;血小板-内皮细胞黏附分子(cluster of differentiation 31, CD31) (货号 15585S)、磷酸化表皮生长因子受体(phosphorylated epidermal growth factor receptor, p-EGFR) (货号 3777T)、表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR) (货号 2232S)和 Alexa Fluor 647 (货号 8940S)偶联二抗购自美国 CST 公司;血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF) (货号 ER30607)、磷酸化细胞外信号调节激酶 1/2 (phosphorylated extracellular signal-regulated kinases 1/2, p-ERK1/2) (货号 ET1603-22)、ERK1/2 (货号 ET1601-29)、GAPDH (货号 R1210-1)和 HRP 偶联二抗(货号 HA1001、HA1006)购自杭州华安生物技术有限公司。

1.1.3 实验仪器 研磨机(型号 UNIPOL-810)购自沈阳科晶自动化设备有限公司;高速低温离心机(规格 5810R)购自德国 Eppendorf 公司;切片图像分析系统(正置荧光显微镜)(型号 DM6 B)、石蜡切片机(型号 RM2255)购自德国 Leica 公司;全景组织细胞定量分析系统(玻片扫描仪)(型号 TissueFAXS Plus S)购自奥地利 TG 公司;电泳仪(型号 EPS-300)、多功能成像仪(型号 5200)购自上海天能科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 第一批 25 只雄性大鼠随机分为 5 组:造模 0 d 组、3 d 组、7 d 组、14 d 组和 28 d 组,实验第 28 天统一安乐死并取大鼠咬肌进行检测分析。第二批 20 只雄性大鼠随机分成 4 组:空白对照组(Ctrl 组)、过载荷正畸拉力组(OT 组)、过载荷正畸拉力+预防性补充硝酸盐组(OT + Nitrate 组)、预防性补充硝酸盐组(Nitrate 组),实验第 28 天统一安乐死并取大鼠咬肌进行检测分析。

1.2.2 模型制备 大鼠为口腔无前磨牙、左右切牙远端中段距离内无牙齿结构的啮齿动物,此间隙内骨和表面黏膜平坦,左右颌远端中间有 3 颗磨牙排列,在施加正畸拉力之前,对口腔进行消毒,然后使用 0.20 mm 的正畸结扎丝将正畸拉簧的一端固定在左上颌骨第一磨牙的牙颈部,拉簧的另一端通过正畸结扎丝固定于上切牙的牙颈部。由于镍钛螺旋弹簧的记忆效应,对第一磨牙施加了(120 $\pm$ 10)g 的恒定近内侧牵引力。为防止正畸矫治器过早脱落或

移位,在上切牙上涂一层薄薄的可流动复合树脂,用 37% 磷酸酸蚀 120 s,冲洗 15 s,干燥后光固化 20 s,使树脂完全覆盖缠绕在牙齿颈部的结扎线,帮助固定。

1.2.3 预防性补充硝酸盐 对于预防性补充硝酸盐组的大鼠,参照相关研究,在实验开始前 7 d 起在大鼠饮水中额外添加 22.4 mmol/L 硝酸盐^[5],以增加硝酸盐摄入量。

1.2.4 组织样本的处理和收集 大鼠咬肌完全解剖并称重,一部分咬肌经 4% 多聚甲醛固定 24~48 h,石蜡包埋组织并用切片机制成 4 μ m 厚的咬肌组织横截面切片,用于组织学分析。另一部分咬肌放入冷冻管中, -80 $^{\circ}$ C 保存以备 Western blot 检测分析。

1.2.5 HE 染色 切片经脱蜡、水合后,使用苏木精和伊红(HE)进行染色并进行图像采集。肌肉纤维横截面通过 ImageJ 软件分析,测量肌纤维大小。

1.2.6 免疫组化染色(immunohistochemistry, IHC)

切片常规脱蜡、水合后在柠檬酸盐缓冲液中通过微波热诱导抗原修复,3% 过氧化氢避光处理 15 min 以阻断内源性过氧化物酶活性,随后用 5% 山羊血清在室温下封闭 30 min。切片分别与以下一抗共同孵育并置于 4 $^{\circ}$ C 过夜: MuRF1 (1:100)、MAFbx (1:100)和 VEGF (1:100)。第二天切片复温 1 h、清洗后与 HRP 偶联二抗(1:500)孵育 1 h,用 3,3'-二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)显影,并用 Mayer 苏木精复染。常规封片并采集图像,并使用 ImageJ 软件量化 IHC 的阳性面积。

1.2.7 免疫荧光染色(immunofluorescence, IF) 切片在 60 $^{\circ}$ C 恒温器中烘烤至少 2~6 h 后,脱蜡、水合、抗原修复和 5% 山羊血清封闭后。滴加 CD31 (1:100)和 HIF-1 α (1:100)过夜孵育。第二天室温复温后,切片与 Alexa Fluor 647 偶联二抗(1:200)孵育 1 h, PBS 洗涤后,使用含 DAPI 的抗荧光淬灭封片液封片,采集图像后使用 ImageJ 软件量化 IF 的相对荧光强度。

1.2.8 Western blot 实验 咬肌样品在含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 缓冲液中研磨以提取蛋白质,通过 BCA 法测定蛋白质浓度后,制备样品。然后经电泳、转膜,并于室温下在含 5% BSA 脱脂奶粉的 TBS-T 中封闭膜 1 h,在 4 $^{\circ}$ C 下与一抗 GAPDH (1:7 000)、MuRF1 (1:1 000)、MAFbx (1:1 000)、p-EGFR (1:100)、EGFR (1:100)、p-AKT (1:100)、AKT (1:100)、p-ERK1/2 (1:100)、

ERK1/2(1:50)一起孵育过夜。次日,将膜与 HRP 结合山羊抗兔/鼠 IgG 二抗(1:50 000)在室温下孵育 1 h,洗涤后显影并使用 ImageJ 软件对印迹图像进行定量。磷酸化蛋白被归一化为各自的总蛋白信号,其他蛋白水平被归一化为 GAPDH 信号的水平。

1.2.9 细胞凋亡检测 通过一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒检测。切片经二甲苯脱蜡、梯度乙醇复水、蒸馏水冲洗后,滴加 20 $\mu\text{g/mL}$ 不含 DNase 的蛋白酶 K 在 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中作用 15~30 min,然后用 PBS 将蛋白酶 K 洗涤干净。按照对应比例(TdT 酶/荧光标记液=1/9)配制适当量的 TUNEL 检测液滴加覆盖于样品上,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中避光孵育 60 min, PBS 洗涤后用封片液封片。图像采集后使用 ImageJ 软件对 FITC 荧光相对表达量进行量化。

1.3 统计学处理 数据分析使用 GraphPad Prism 9.5 软件完成。所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,随后进行 Tukey 事后检验以成对比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 骀位变化可导致咬肌萎缩 大鼠口腔内构建过载荷正畸拉力模型(图 1 A),在构建模型 0、3、7、14、28 d 后大鼠体质量随时间无明显变化,骀位变化随时间加重,咬肌重量随时间呈下降趋势,且在第 14 天起与对照组(第 0 天)相比,差异有统计学意义($F = 5.013, P < 0.05$)。对咬肌组织进行切片染色,HE 染色观察肌细胞形态,IHC 检测肌萎缩因子的蛋白表达水平,ImageJ 用于分析 HE 染色单位肌纤维面积和 IHC 阳性表达区域。HE 结果显示与对照组相比,施加过载荷正畸拉力组的肌细胞质变得稀疏,染色较浅,部分可以看到细胞质内出现空泡化现象,同时纤维间质增多,肌纤维排列紊乱,单位肌纤维横截面积随时间减小,差异在第 7 天起较对照组有统计学意义($F = 13.95, P < 0.05$),IHC 和 Western blot 结果显示,施加过载荷正畸拉力 MAFbx 和 MuRF1 蛋白表达随时间上调,差异在第七天较对照组有统计学意义,IHC: MAFbx ($F = 49.66, P < 0.05$); MuRF1 ($F = 48.85, P < 0.05$)。Western blot: MAFbx ($F = 40.57, P < 0.05$); MuRF1 ($F = 34.72, P < 0.05$),表明过载荷正畸拉力引发的骀位变化可能会导致咬肌萎缩的发生。见图 1。

2.2 骀位变化伴随组织低氧状态 IF 检测 HIF-1 α 的蛋白表达水平,ImageJ 用于阳性区域定量分析。结果显示,施加过载荷正畸拉力后,HIF1- α 蛋

白表达水平随时间逐渐增加,自第 3 天起与对照组相比,差异有统计学意义($F = 6.172, P < 0.05$)。见图 2。说明增加正畸过载荷所带来的骀位变化可能伴随着咬肌组织低氧的发生,并且组织低氧的发生早于咬肌萎缩的发生,提示组织低氧可能是引起咬肌萎缩的重要原因。

2.3 咬肌萎缩过程中伴随血管生成的抑制 咬肌的萎缩不仅表现在咬肌细胞本身的变化,血管生成相关指标如 CD31 和 VEGF 也可能发生变化。通过 IF 和 IHC 检测 CD31 和 VEGF 的蛋白表达水平,使用 ImageJ 对阳性区域进行定量分析。结果显示,正畸拉力施加后 CD31 和 VEGF 的蛋白表达水平随时间逐渐下降,在第七天显著低于对照组,差异有统计学意义(CD31: $F = 19.09, P < 0.05$; VEGF: $F = 52.28, P < 0.05$)。该结果提示,在骀位变化引起的咬肌萎缩过程中伴随着血管生成的抑制。见图 3。

2.4 预防性补充硝酸盐可抵抗因骀位变化带来的组织低氧 通过 IF 检测 HIF-1 α 蛋白的表达水平,使用 ImageJ 对阳性区域进行定量分析。结果显示,施加过载荷正畸拉力 + 预防性补充硝酸盐组的 HIF1- α 表达水平显著低于单纯施加过载荷正畸拉力组,差异有统计学意义($F = 10.48, P < 0.05$)。表明预防性补充硝酸盐可有效缓解咬肌的低氧状态。见图 4。

2.5 预防性补充硝酸盐可预防因骀位变化带来的咬肌萎缩 HE 染色观察肌细胞形态,IHC 和 Western blot 检测肌萎缩因子的蛋白表达水平,ImageJ 用于分析 HE 染色单位肌纤维面积、IHC 阳性表达区域以及 Western blot 定量。HE 结果显示,施加过载荷正畸拉力 + 预防性补充硝酸盐组的单位肌纤维横截面积显著大于单纯施加过载荷正畸拉力组,差异有统计学意义($F = 13.79, P < 0.05$)。IHC 和 Western blot 结果显示,施加过载荷正畸拉力 + 预防性补充硝酸盐组的肌萎缩因子 MAFbx 和 MuRF1 蛋白表达也明显低于单纯施加过载荷正畸拉力组,差异有统计学意义。IHC: MAFbx ($F = 46.26, P < 0.05$); MuRF1 ($F = 49.6, P < 0.05$)。Western blot: MAFbx ($F = 38.93, P < 0.05$); MuRF1 ($F = 12.19, P < 0.05$)。表明预防性补充硝酸盐对因骀位变化引起的咬肌萎缩具有显著的保护作用。见图 5。

2.6 预防性补充硝酸盐可促进血管新生 IF 和 IHC 检测分别用于检测 CD31 和 VEGF 的蛋白表达水平,Image J 用于阳性区域定量分析。结果显示,

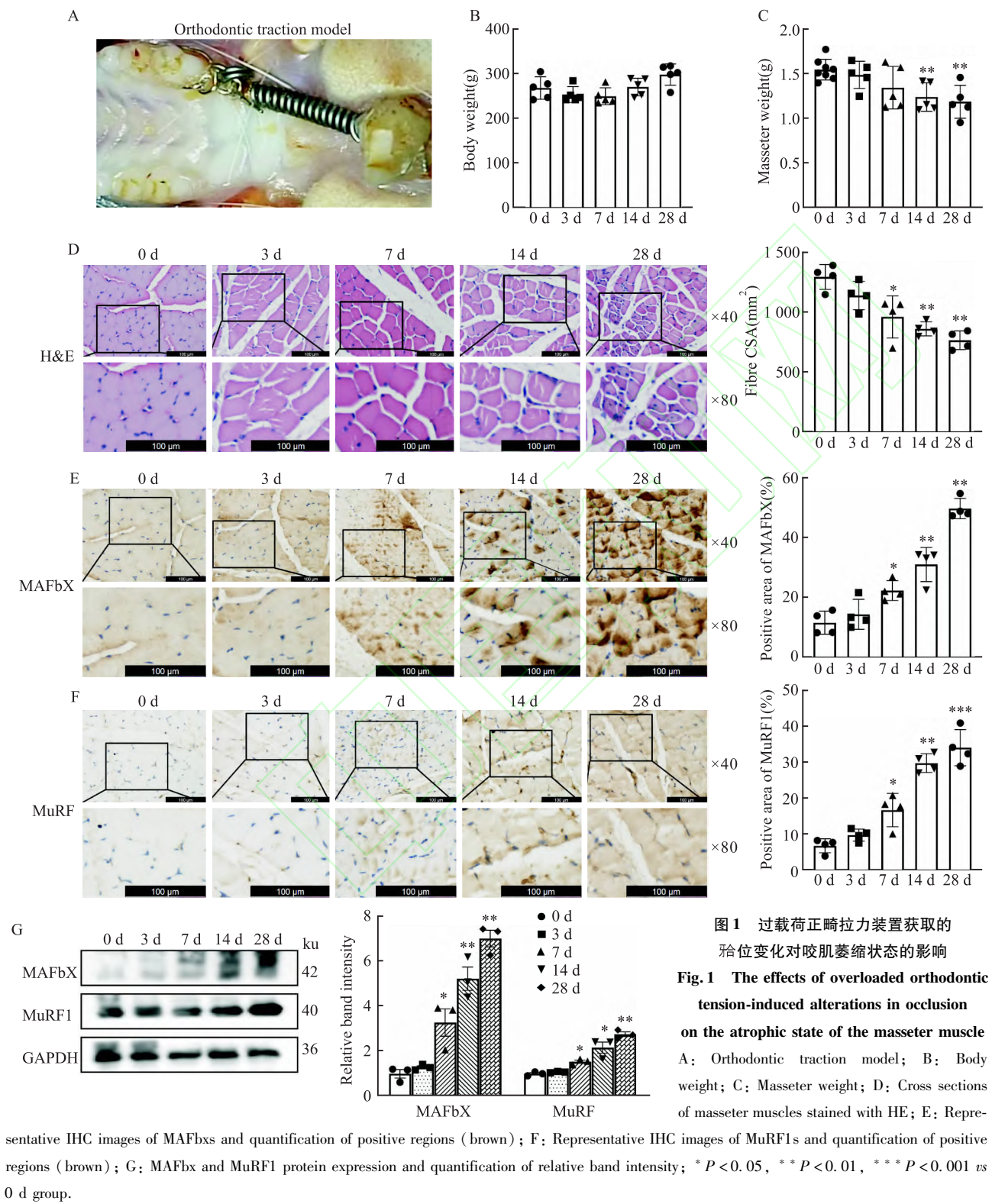


图1 过载荷正畸拉力装置获取的
颌位变化对咬肌萎缩状态的影响

Fig.1 The effects of overloaded orthodontic tension-induced alterations in occlusion on the atrophic state of the masseter muscle

A: Orthodontic traction model; B: Body weight; C: Masseter weight; D: Cross sections of masseter muscles stained with HE; E: Representative IHC images of MAFbxs and quantification of positive regions (brown); F: Representative IHC images of MuRF1s and quantification of positive regions (brown); G: MAFbx and MuRF1 protein expression and quantification of relative band intensity; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs 0 d group.

施加过载荷正畸拉力 + 预防性补充硝酸盐组的 CD31 和 VEGF 表达水平显著高于单纯施加过载荷正畸拉力组, 差异有统计学意义 (CD31: $F = 34.31$, $P < 0.05$; VEGF: $F = 9.594$, $P < 0.05$)。这些结果表明, 硝酸盐的预防性补充在一定程度上抵消了过

载荷正畸拉力所诱导的咬肌萎缩过程中血管的抑制, 有助于促进血管新生。见图 6。

2.7 预防性补充硝酸盐可通过 EGFR-AKT/ERK1/2 信号通路的抗凋亡作用预防咬肌萎缩
Western blot 检测 EGFR、AKT 和 ERK1/2 蛋白及其

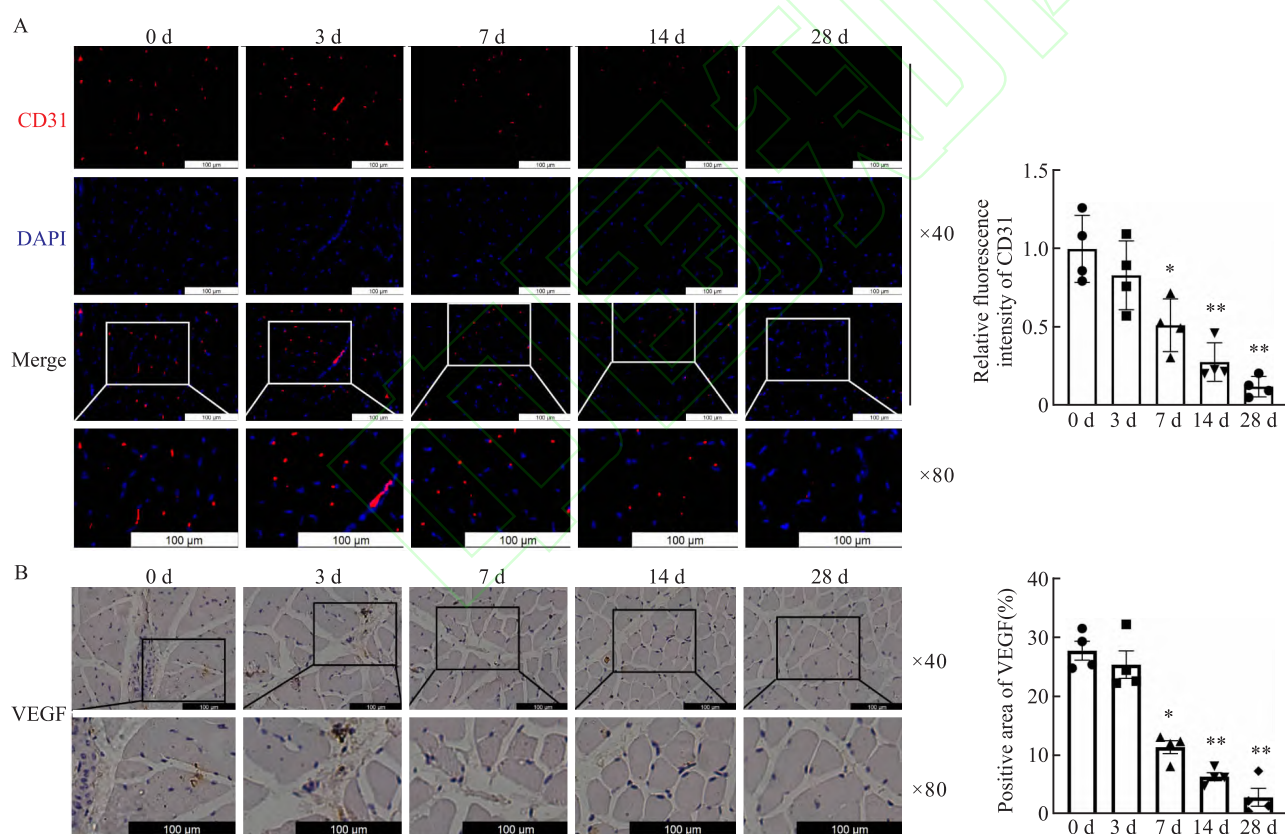
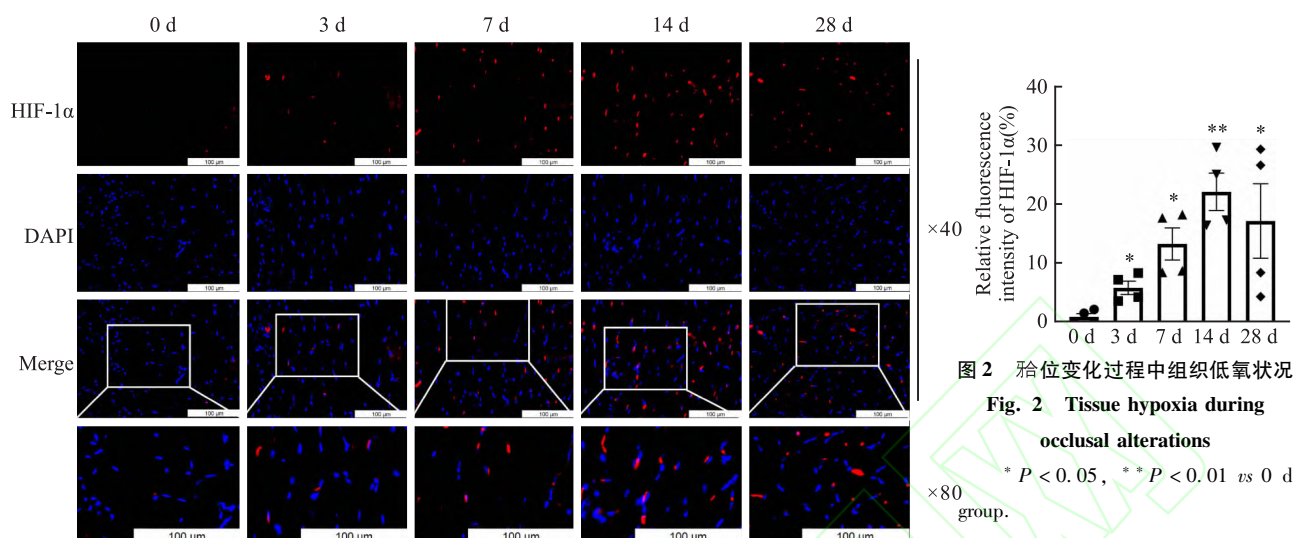


图 3 咬肌萎缩过程中血管相关指标变化

Fig. 3 Changes in vascular indices during masseter muscle atrophy

A: Representative immunofluorescence images of CD31 (red) and DAPI (blue) staining; B: Representative IHC images of VEGFs and quantification of positive regions (brown); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 0 d group.

磷酸化蛋白的表达水平,使用一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒检测咬肌组织细胞凋亡情况,ImageJ 用于定量分析。结果显示,施加过载荷正畸拉力 + 预防性补充硝酸盐组的磷酸化蛋白表达水平显著高于单纯施加过载荷正畸拉力组,差异有统计学意义 (p-EGFR: $F = 21.27$, $P < 0.05$; p-AKT: $F = 47.85$,

$P < 0.05$; p-ERK1/2: $F = 45.03$, $P < 0.05$)。同时,施加过载荷正畸拉力 + 预防性补充硝酸盐组的细胞凋亡率显著低于单纯施加过载荷正畸拉力组,差异有统计学意义 ($F = 23.01$, $P < 0.05$)。这表明硝酸盐的抗咬肌萎缩作用可能通过 EGFR-AKT/ERK1/2 信号通路的抗凋亡效应发挥。见图 7。

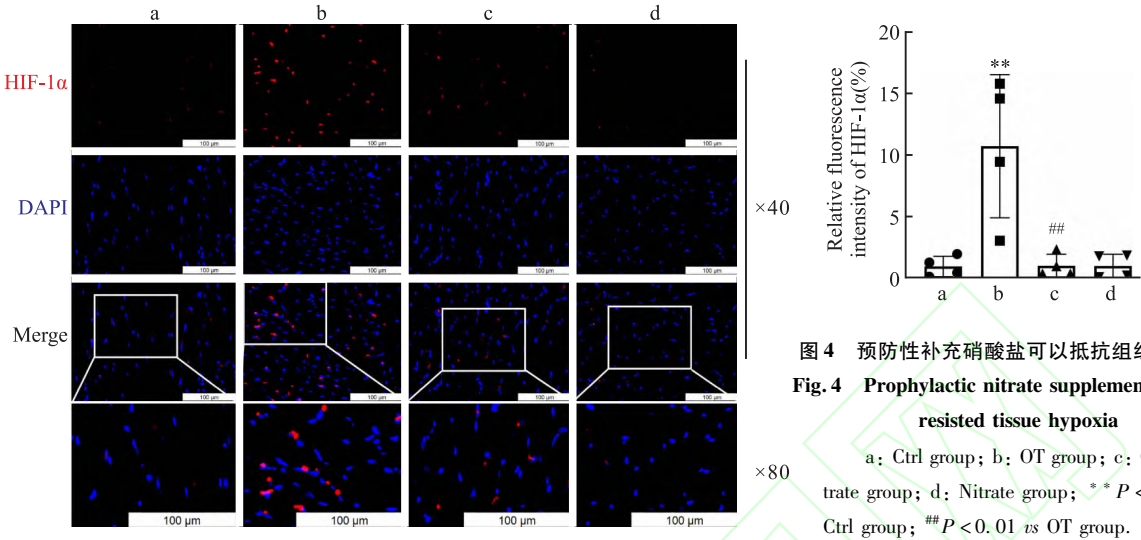


图4 预防性补充硝酸盐可以抵抗组织低氧
Fig. 4 Prophylactic nitrate supplementation resisted tissue hypoxia

a: Ctrl group; b: OT group; c: OT + Nitrate group; d: Nitrate group; ** $P < 0.01$ vs Ctrl group; ## $P < 0.01$ vs OT group.

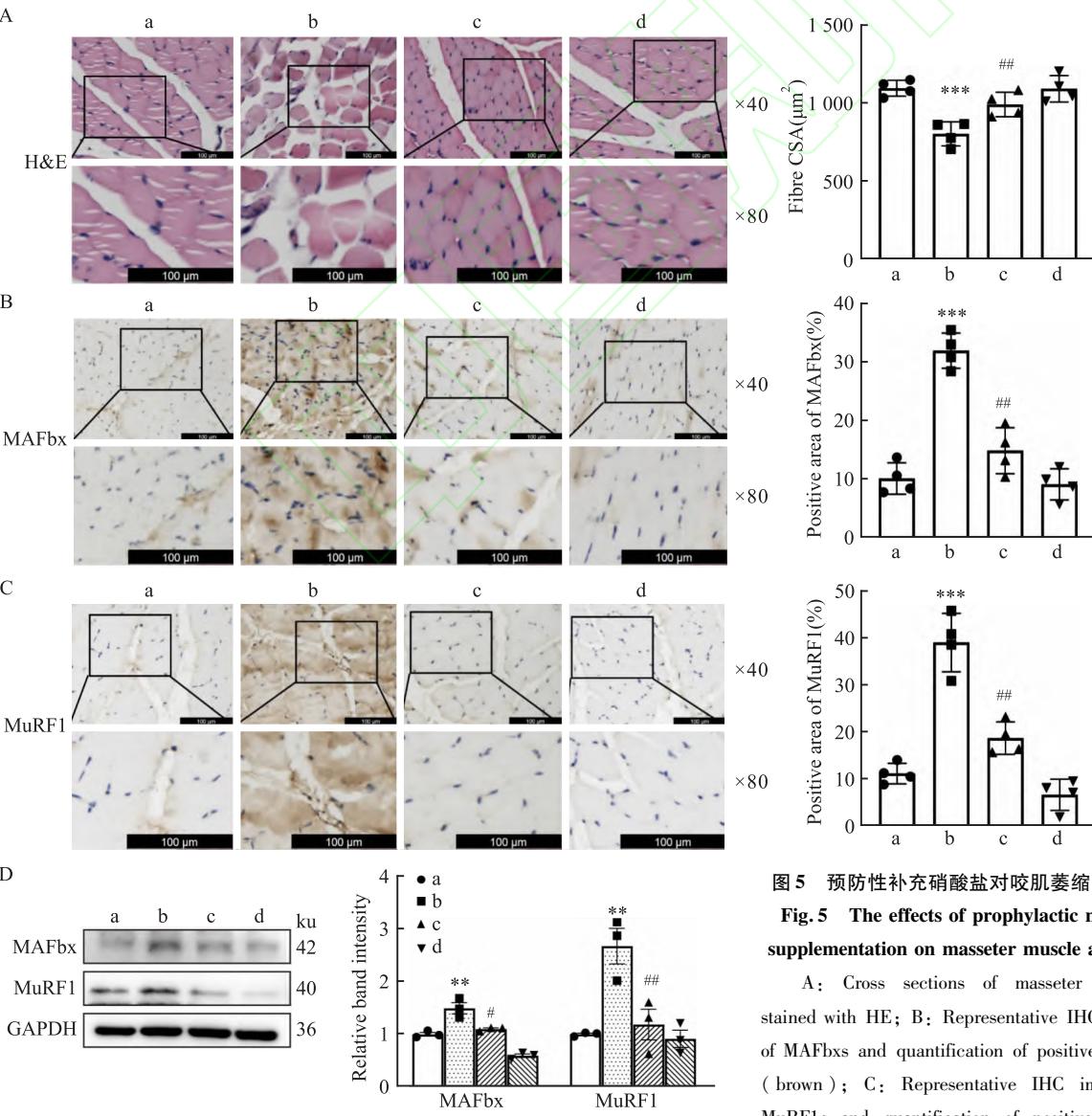


图5 预防性补充硝酸盐对咬肌萎缩的影响
Fig. 5 The effects of prophylactic nitrate supplementation on masseter muscle atrophy

A: Cross sections of masseter muscles stained with HE; B: Representative IHC images of MAFbx and quantification of positive regions (brown); C: Representative IHC images of MuRF1s and quantification of positive regions (brown); D: MAFbx and MuRF1 protein expression and quantification of relative band intensity; a: Ctrl group; b: OT group; c: OT + Nitrate group; d: Nitrate group; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Ctrl group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs OT group.

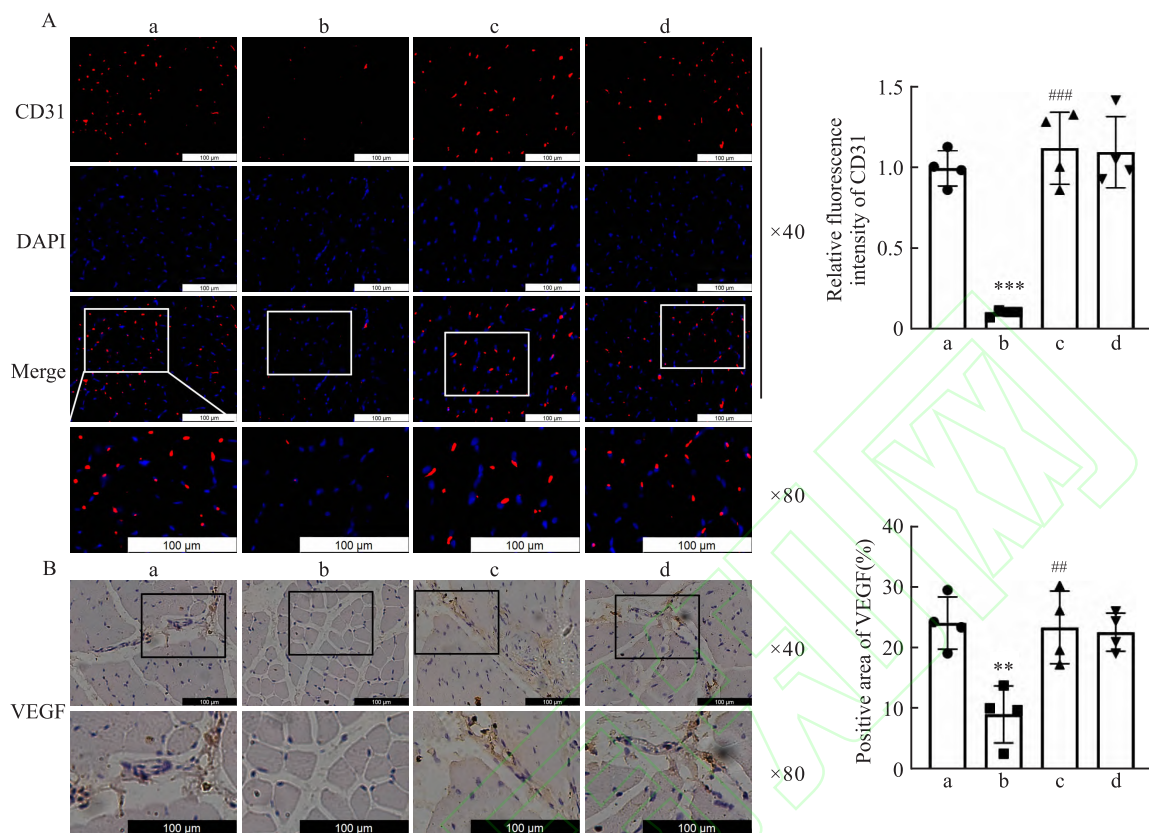


图6 预防性补充硝酸盐对血管生成的影响

Fig. 6 The effects of prophylactic nitrate supplementation on angiogenesis

A: Representative immunofluorescence images of CD31 (red) and DAPI (blue) staining; B: Representative IHC images of VEGFs and quantification of positive regions (brown); a: Ctrl group; b: OT group; c: OT + Nitrate group; d: Nitrate group; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Ctrl group; ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs OT group.

3 讨论

本研究证明了施加过载荷正畸拉力这一操作带来的殆位变化是导致咬肌萎缩的原因之一,但未能将正畸过程中其他操作如拔牙、扩弓等也纳入研究,这些操作可能通过改变咬肌的负荷、张力或血流等途径对肌肉产生影响,有待进一步的完善性研究。

同时本研究现实施加过载荷正畸力导致殆位变化所带来的组织低氧早于咬肌萎缩的发生,这一发现提示组织低氧可能是咬肌萎缩的重要诱因。据报道^[6],组织低氧通过多种机制影响骨骼肌的健康,包括能量代谢障碍、氧化应激、蛋白质合成与分解失衡^[7]、信号通路的改变以及循环系统^[8]的改变^[9]。HIF-1 α 表达增加会调控与能量代谢、血管生成和细胞凋亡相关的基因,进而影响肌肉细胞的生存和功能,最终促进肌肉萎缩。低氧还会影响循环系统,导致血液供应不足,进一步加剧肌肉组织的缺氧状况,形成恶性循环。长期的低氧和血液供应不足可引起肌肉组织的慢性损伤和退化,加速肌肉萎

缩。

鉴于硝酸盐和一氧化氮在组织低氧中的密切联系^[10],有研究^[11-12]证明硝酸盐可能在对抗组织低氧及促进血管生成方面的重要作用,进一步说明了预防性补充硝酸盐对于防止咬肌萎缩的潜在效益。然而,硝酸盐如何调控缺氧诱导因子 HIF-1 α 的表达还有待进一步研究。骨骼肌是体内硝酸盐的最大储存库^[13]、肌细胞可以通过硝酸盐转运体 (Sialin) 将硝酸盐主动摄取到肌细胞内储存^[14],本研究中,硝酸盐激活 EGFR 及其下游的 AKT/ERK1/2 信号通路,而 AKT/ERK1/2 信号通路的激活有助于细胞周期进程、代谢调节及应激反应,提示硝酸盐可能在肌细胞内直接发挥重要生理作用。

考虑到 Sialin 在转运硝酸盐中具有的重要作用,其转运功能来自电位 ($\Delta\psi$) 或 pH 梯度 (ΔpH) 或两者兼有之的贡献^[15],而组织低氧会带来组织电位和 pH 的变化,那么殆位变化所带来的组织低氧或其本身是否会影响 Sialin 的转运功能进而影响硝酸盐代谢也有待进一步探讨。总之,组织低氧、硝酸盐

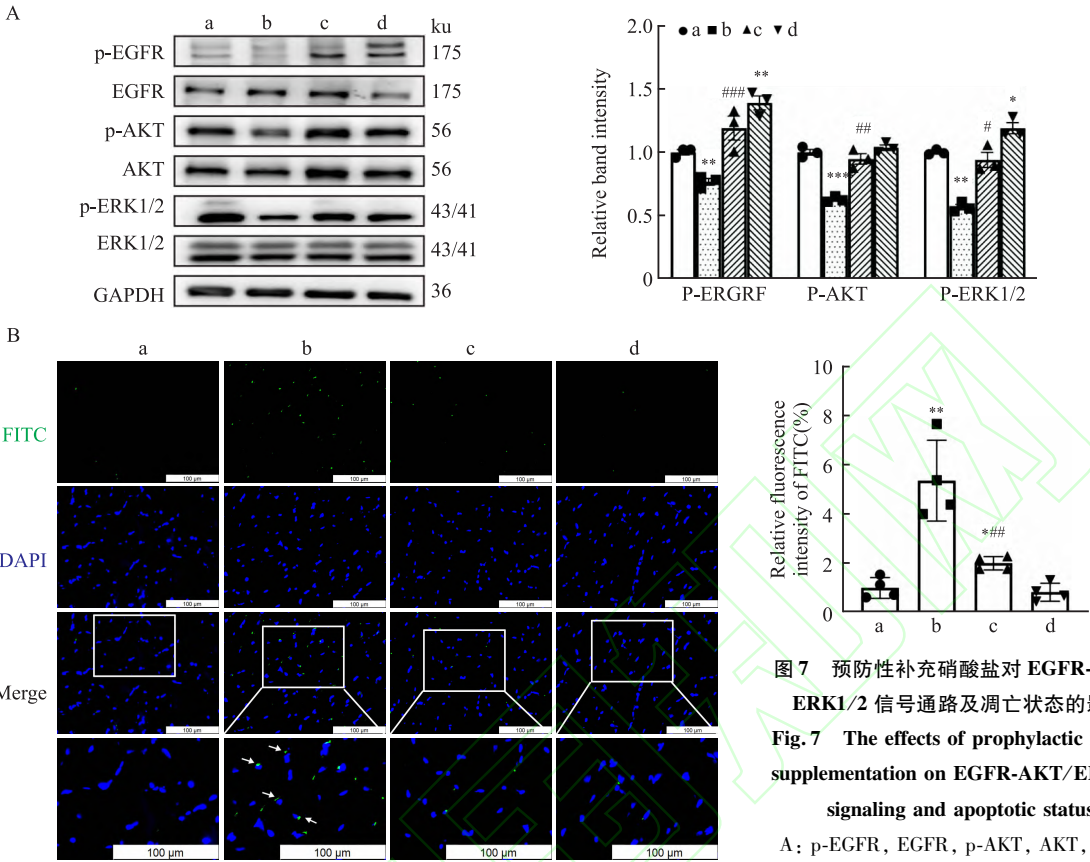


图7 预防性补充硝酸盐对EGFR-AKT/ERK1/2信号通路及凋亡状态的影响

Fig. 7 The effects of prophylactic nitrate supplementation on EGFR-AKT/ERK1/2 signaling and apoptotic status

A: p-EGFR, EGFR, p-AKT, AKT, p-ERK1/2 and ERK1/2 protein expression and quantification of

relative band intensity; B: Cellular apoptosis was evaluated using the one-step TUNEL apoptosis assay kit; a: Ctrl group; b: OT group; c: OT + Nitrate group; d: Nitrate group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs ctrl group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs OT group.

代谢、EGFR-AKT/ERK1/2 信号和咬肌萎缩之间具有密切的联系,对其相互影响机制的进一步研究对于揭示肌萎缩机制及预防具有重要意义。

综上所述,正畸过程中施加过载荷正畸力这一操作所带来的殆位变化会伴随组织低氧状态,导致咬肌萎缩的发生,通过预防性补充硝酸盐可以促进血管生成、解除组织低氧状态以及预防咬肌萎缩,并且此作用可通过 EGFR-AKT/ERK1/2 信号通路的抗细胞凋亡来发挥,这些发现为咬肌萎缩乃至其他肌肉萎缩的防治提供了新的思路。

参考文献

[1] Chen Y, Wu J. Aging-related sarcopenia: metabolic characteristics and therapeutic strategies[J]. Aging Dis, 2024, 16(2): 1003-22. doi:10.14336/AD.2024.0407.

[2] Jones A M, Vanhatalo A, Seals D R, et al. Dietary nitrate and nitric oxide metabolism: mouth, circulation, skeletal muscle, and exercise performance[J]. Med Sci Sports Exerc, 2021, 53(2): 280-94. doi:10.1249/MSS.0000000000002470.

[3] Benjamim C J R, Lopes da Silva L S, da Silva Gonçalves L, et al. The effects of dietary nitrate ingestion on physical performance tests in 50-65 years old postmenopausal women: a pilot random-

ized, double-blind, placebo-controlled, and crossover study[J]. Clin Nutr, 2024, 43(7): 1642-6. doi:10.1016/j.clnu.2024.05.031.

[4] Jędrejko M, Jędrejko K, Gómez-Renaud V M, et al. Exploring the impact of alternative sources of dietary nitrate supplementation on exercise performance[J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(7): 3650. doi:10.3390/ijms25073650.

[5] Malikova E, Carlström M, Kmecova Z, et al. Effects of inorganic nitrate in a rat model of monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension[J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2020, 126(2): 99-109. doi:10.1111/bcpt.13309.

[6] Yin A, Fu W, Elengickal A, et al. Chronic hypoxia impairs skeletal muscle repair via HIF-2 α stabilization[J]. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2024, 15(2): 631-45. doi:10.1002/jcsm.13436.

[7] Di Girolamo F G, Fiotti N, Sisto U G, et al. Skeletal muscle in hypoxia and inflammation: insights on the COVID-19 pandemic [J]. Front Nutr, 2022, 9: 865402. doi:10.3389/fnut.2022.865402.

[8] Lee C, Agha O, Liu M, et al. Rotator cuff fibro-adipogenic progenitors demonstrate highest concentration, proliferative capacity, and adipogenic potential across muscle groups[J]. J Orthop Res, 2020, 38(5): 1113-21. doi:10.1002/jor.24550.

[9] Li F, Yin C, Ma Z, et al. PHD3 mediates denervation skeletal muscle atrophy through NF- κ B signal pathway[J]. FASEB J, 2021, 35(4): e21444. doi:10.1096/fj.202002049R.

- [10] Raubenheimer K, Hickey D, Leveritt M, et al. Modulating inflammation and immune function through the dietary nitrate-nitrite-nitric oxide pathway to promote vascular health: insights from a randomized, controlled study[J]. *Free Radic Biol Med*, 2023, 201: 51–2. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2023.03.209.
- [11] Tan L, Stagg L, Hanlon E, et al. Associations between vegetable nitrate intake and cardiovascular disease risk and mortality: a systematic review[J]. *Nutrients*, 2024, 16(10): 1511. doi:10.3390/nu16101511.
- [12] 张 姝, 杨 扬, 李德龙, 等. 低浓度硝酸盐对人血管内皮细胞缺氧复氧损伤保护作用的实验研究[J]. *北京口腔医学*, 2020, 28(6): 301–5.
- [12] Zhang S, Yang Y, Li D L, et al. The experimental study of the protective effect of low concentration nitrate on the hypoxia reoxygenation injury of vascular endothelial cells[J]. *Beijing J Stomatol*, 2020, 28(6): 301–5.
- [13] Upanan S, Lee J, Tunau-Spencer K J, et al. High nitrate levels in skeletal muscle contribute to nitric oxide generation *via* a nitrate/nitrite reductive pathway in mice that lack the nNOS enzyme[J]. *Front Physiol*, 2024, 15: 1352242. doi:10.3389/fphys.2024.1352242.
- [14] Srihirun S, Park J W, Teng R, et al. Nitrate uptake and metabolism in human skeletal muscle cell cultures[J]. *Nitric Oxide*, 2020, 94: 1–8. doi:10.1016/j.niox.2019.10.005.
- [15] Schmiede P, Donnelly L, Elghobashi-Meinhardt N, et al. Structure and inhibition of the human lysosomal transporter Sialin[J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 4386. doi:10.1038/s41467-024-48535-3.

Prophylactic nitrate supplementation mediates EGFR-AKT/ERK1/2 pathway to prevent masseter muscle atrophy

Liu Wei^{1,2,3}, Liu Xiaoyu^{1,2,3}, Wu Tingting^{1,2,3}

(¹*School of Stomatology, Anhui Medical University, Hefei 230032*; ²*Affiliated Stomatological Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230032*; ³*Key Lab. of Oral Diseases Research of Anhui Province, Hefei 230032*)

Abstract Objective To investigate the effects of occlusal alterations on masseter muscle atrophy after the application of excessive orthodontic tension, and the role and mechanism of prophylactic nitrate supplementation in the prevention and treatment of masseter muscle atrophy. **Methods** Eight-week-old male SD rats were selected. An orthodontic appliance was placed in the oral cavity of the rats to obtain a rat model of occlusal alterations, and the masseter muscles were taken at various times after excessive orthodontic force application for relevant tests. Masseter muscle weighing, HE staining, Western blot and immunohistochemistry assays were used to detect the atrophic state of the masseter muscle. Meanwhile, immunofluorescence staining was used to detect the hypoxic status of the masseter muscle, and immunofluorescence and immunohistochemical staining were used to detect the angiogenic status [cluster of differentiation 31 (CD31), vascular endothelial growth factor (VEGF)]. After 28 days of prophylactic nitrate supplementation and application of orthodontic tension, the status of masseter muscle atrophy, tissue hypoxia, and angiogenesis were assessed as described above. In addition, Western blot assays for detecting epidermal growth factor receptor (EGFR), protein kinase B (AKT), extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK1/2) protein expressions, and their corresponding phosphorylated proteins. One Step TUNEL Apoptosis Assay Kit was used to detect masseter muscle apoptosis. **Result** The molar displacement caused by overload traction could lead to masseter muscle atrophy, accompanied by hypoxia in the masseter tissue and decreased expression of angiogenesis-related proteins. Preventive nitrate supplementation could prevent masseter muscle atrophy, alleviate tissue hypoxia, and promote angiogenesis. The anti-apoptotic effects of the EGFR-AKT/ERK1/2 signaling pathway contributed to the preventive effects of nitrate on masseter muscle atrophy. **Conclusion** Occlusal alterations brought about by excessive orthodontic tension exertion in rats may lead to masseter muscle atrophy, and prophylactic nitrate supplementation may resist hypoxia and atrophy of masseter muscle tissues by promoting angiogenesis through the anti-apoptotic effects of the EGFR-AKT/ERK1/2 pathway.

Key words occlusal alterations; masseter muscle atrophy; nitrate; hypoxia; angiogenesis; 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, 2022xkfyts03).

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